



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115316** (13) **C2**  
(51) МПК (2017.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2014 04032</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Саймонс Петрус Йоханнес (NL), Бун Луїс (NL)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>13.09.2012</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>БІОСЕРОКС ПРОДАКТС Б.В., Yalelaan 46, NL-3584 CM Utrecht, The Netherlands (NL)</b>
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.10.2017</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр. №207</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>1116092.6</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 2011123552 A1, 26.05.2011 Santa Cruz Biotechnology, INC : "anti-OX40- receptor antibody (H-10): sc376014" January 2001 (2001-01), retrieved from the Internet: URL: <a href="http://datasheets.scbt.com/sc-376014.pdf">http://datasheets.scbt.com/sc-376014.pdf</a> Santa Cruz Biotechnology, INC : "anti-OX40- receptor antibody (H-133): sc376014" January 2001 (2001-01), retrieved from the Internet: URL: <a href="http://datasheets.scbt.com/sc-11403.pdf">http://datasheets.scbt.com/sc-11403.pdf</a>
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>16.09.2011</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>GB</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>11.08.2014, Бюл.№ 15</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.10.2017, Бюл.№ 20</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>РСТ/GB2012/052268, 13.09.2012</b>	

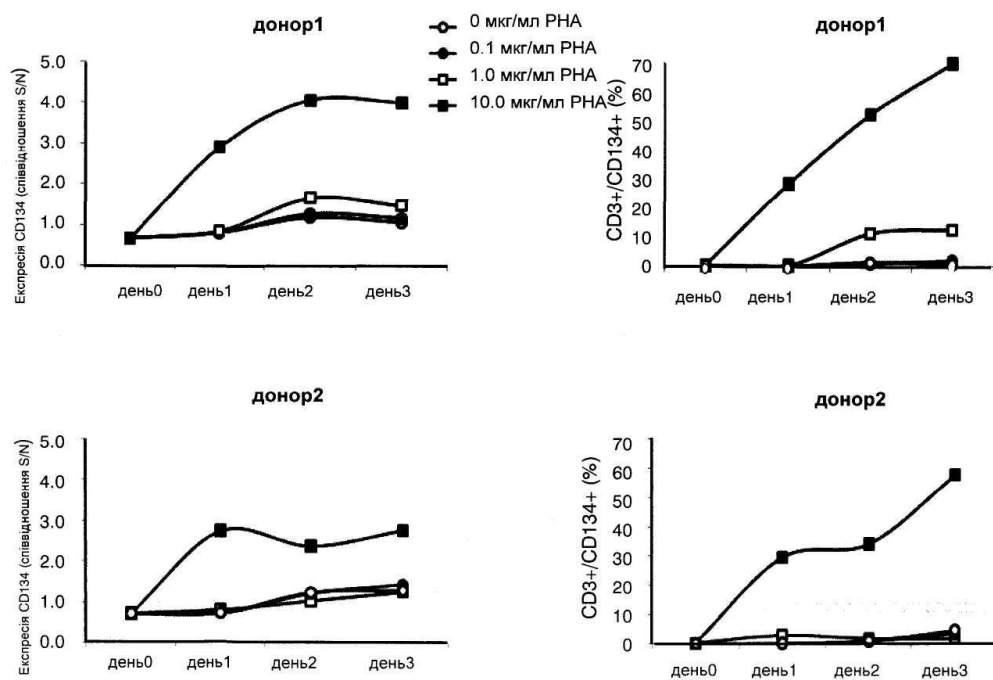
**(54) ЗВ'ЯЗУВАЛЬНА МОЛЕКУЛА, ЯКА ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З CD134 ЛЮДИНИ, ТА ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ, ЩО ЇЇ МІСТИТЬ**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до зв'язувальної молекули, яка зв'язується з CD134, молекули нуклеїнової кислоти, що її кодує, вектору, клітини-хазяїна, способу одержання даної зв'язувальної молекули. Винахід також належить до фармацевтичної композиції, що містить зв'язувальну молекулу, та способу посилення імунної відповіді у суб'єкта.

UA 115316 C2

Фігура 1



## Область техніки

Даний винахід відноситься до антитіл, до використання таких антитіл, і зокрема до антитіл, які зв'язуються з CD134, для лікування раку.

## Рівень техніки

Посилення протипухлинної функції Т-лімфоцитів представляє собою унікальний спосіб лікування раку. Існує велика кількість даних, що свідчать про те, що клітини пухлин "уникають" імунної системи, набуваючи активну імунну толерантність, головним чином за посередництва регуляторних Т-лімфоцитів (Tregs; Quezada et al. *Immunol Rev* 2011; 241:104-118). Таким чином, рівновага між ефекторними (тобто, прямим або непрямим знищенням клітин пухлини) Т-лімфоцитами (Тефф) і тими, що викликають імунну толерантність (тобто, придушення ефекторної функції і виживання Тефф) регуляторними Т-лімфоцитами (Трег), мабуть, являється критичним для ефективної протипухлинної імунотерапії. Інакше кажучи, ефективної протипухлинної імунної відповіді можна досягти шляхом посилення ефекторної функції Тефф та/або шляхом ослаблення пригнічуючої функції пухлина-специфічних Трег. Ключовим рецептором, який, як було показано, що опосередковує такі реакції, являється рецептор CD134 (OX40) (Sugamura, K, Ishii, N, Weinberg, A. Therapeutic targeting of the effector T-cell co-stimulatory molecule OX40. *Nature Rev Imm* 2004; 4: 420-431).

CD134 (також відомий, як OX40, TNFRSF4 і ACT35) являється членом підродини рецепторів фактору некрозу пухлини. Даний поверхневий ко-стимулюючий рецептор CD134 експресується на мембрані активованих Т-лімфоцитів і відіграє важливу роль в їх виживанні та функціонуванні. Присутність CD134-експресуючих Т-лімфоцитів було продемонстровано в різних злоякісних пухлинах людини і в дренажних лімфатичних вузлах ракових пацієнтів (Ramstad et al. *Am J Surg* 2000; 179: 400-406; Vetto et al. *Am J Surg* 1997; 174: 258-265).

Зшивання *in vivo* рецептора CD134 миші (або за допомогою розчинних гібридних білків з ліганду OX40 миші (OX40L)-імуноглобуліну, або за допомогою імітаторів OX40L миші, таких як CD134-специфічні антитіла) у мишей з пухлиною посилюється протипухлинний імунітет, що призводить до виживання без пухлини в моделях на мишах з різними лініями клітин злоякісних пухлин мишей, наприклад, лімфоми, меланоми, саркоми, раку товстої і ободової кишки, раку молочної залози і гліоми (Sugamura et al. *Nature Rev Imm* 2004; 4: 420-431).

Було запропоновано посилювати імунну відповідь ссавців на антиген шляхом захоплення OX40R за допомогою застосування агента, що зв'язує OX40R (WO 99/42585; Weinberg, 2000). Хоча зазначений документ стосується головним чином до OX40R-зв'язуючих агентів, особливу увагу приділено застосуванню OX40L або його частини; розкриття анти-OX40 антитіл в їх контексті еквівалентно OX40L. Дійсно, коли група Weinberg перевела науковий пошук в рамках дослідження на нижчих приматах, вони знову свідомо обрали антитіло, яке зв'язується з OX40L-зв'язуючим сайтом і в цілому імітує OX40L.

Al-Shamkhani et al. (*Eur J Chem* 1996; 26: 1695-1699) застосовували анти-OX40 антитіло під назвою OX86, яке не блокувало зв'язування OX40L, щоб визначити диференціальну експресію OX40 в активованих Т-лімфоцитах миші; Hirschhorn-Cymerman et al. (*J Exp Med* 2009; 206: 1103-1116) застосовували OX86 разом з циклофосфамідом в моделі на мишах в якості потенційної хіміотерапії. Однак не можна очікувати, що OX86 буде зв'язуватися з OX40 людини, і, коли передбачається вибір антитіла, яке могло би бути ефективним для організму людини, то опираючись на роботи Weinberg, можна вибрати антитіло, яке дійсно зв'язується з OX40L-зв'язуючим сайтом.

Зшивання *in vivo* рецептора CD134 людини (за допомогою антитіл, що специфічно направлені проти CD134 людини, які взаємодіють з OX40L-зв'язуючим доменом на CD134 людину; Патент США 2009/0214560 A1) у мишей з важким поєднаним імунодефіцитом (SCID) призводить до посилення протипухлинного імунітету, що веде до зменшенню росту пухлин різних злоякісних пухлинних ліній клітин людини, наприклад, лімфоми, раку передміхурової залози, раку товстої і ободової кишки і раку молочної залози.

Точний механізм протипухлинної імунної відповіді, опосередкованої зшиванням рецептора CD134 людини, у людей ще не з'ясований, але передбачається, що він опосередковується трансмембранним сигнальним шляхом CD134, який стимулюється взаємодією з OX40L. Така взаємодія опосередковується зв'язуванням тримірного OX40L з CD134. У поточній терапії при лікуванні протиракових пухлин застосування тримерізованого ліганду OX40 пропонується в якості більш ефективного засобу, ніж анти-OX40 антитіла (Morris et al. *Mol Immunol* 2007; 44: 3112-3121).

## Суть винаходу

В даний час автори заявки несподівано виявили, що для того, щоб викликати опосередковану Т-лімфоцитами протипухлинну активність, можна застосовувати ізольовані

зв'язувальні молекули, які зв'язуються з CD134, причому зазначена зв'язувальна молекула не перешкоджає зв'язуванню рецептора CD134 людини (CD134) з лігандом OX40 (OX40L), що призводить до посилення імунної відповіді, що характеризується посиленням імуностимулюючої/ефекторної функції Т-ефекторних клітин та/або проліферацією зазначених клітин та/або придушенням імуносупресорної функції регуляторних Т-клітин.

Отже, відповідно до даного винаходу запропоновані ізольовані зв'язувальні молекули, які зв'язуються з CD134 людини, причому зазначена зв'язувальна молекула не перешкоджає зв'язуванню рецептора CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 (OX40L).

Такі зв'язувальні молекули включають відповідні анти-CD134 антитіла, антиген-зв'язувальні фрагменти зазначених анти-CD134 антитіл і похідні зазначених анти-CD134 антитіл. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначена зв'язувальна молекула зв'язується з CD134 людини з  $K_d$   $1 \times 10^{-7}$  або менше. Зв'язувальна молекула має агоністичну активність по відношенню до CD134 на поверхні ефекторних Т-клітин людини та/або антагоністичну активність по відношенню до CD134 на поверхні регуляторних Т-клітин людини. Згідно з деякими додатковими варіантами реалізації зазначена зв'язувальна молекула являється моноклональним антитілом людини, яка специфічно зв'язується з CD134 людини з  $K_d$  при 100 нмоль або менше, переважно менше ніж 50 нм, більш переважно менше ніж 20 нм.

Також відповідно до даного винаходу запропонована композиція, яка містить одну або більше зв'язувальних молекул і фармацевтично прийнятну основу. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначена зв'язувальна молекула являється моноклональним антитілом по відношенню до CD134 людини або його антиген-зв'язувальним фрагментом. Зазначена композиція може також містити додаткові фармацевтичні агенти, такі як імунотерапевтичний агент, хіміотерапевтичний агент і агенти для гормональної терапії.

Також відповідно до даного винаходу запропоновано способи застосування зазначених зв'язувальних молекул для діагностики та лікування. Згідно з деякими варіантами реалізації запропоновано спосіб лікування або профілактики раку у ссавців, що включає введення вказаному ссавцю терапевтично ефективної кількості зв'язувальної молекули або композиції, що містить зв'язувальну молекулу, яка розкривається в даній заявці. Згідно з деякими варіантами реалізації запропоновано спосіб посилення імунної відповіді у ссавця, що включає введення вказаному ссавцю терапевтично ефективної кількості зв'язувальної молекули. Згідно з конкретними варіантами реалізації зв'язувальна молекула, що застосовується при реалізації зазначених способів, являється моноклональним антитілом до CD134 людини або його антиген-зв'язувальним фрагментом, що зв'язується з CD134 людини, причому вказане антитіло не перешкоджає зв'язуванню рецептора CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 (OX40L).

Також даний винахід відноситься до молекул нуклеїнових кислот, які кодують послідовність амінокислот зв'язувальної молекули, вектори, що містять такі нуклеїнові кислоти, клітинні хазяїни, що містять зазначені вектори, і способи отримання зазначених зв'язувальних молекул.

Також даний винахід забезпечує інші аспекти, які стануть очевидними з повного розкриття, включаючи пункти формули винаходу.

Опис креслень

Даний винахід описано з посиланнями на додані креслення:

Фігура 1. Часовий хід і залежність "доза-ефект" для впливу PHA-M на експресію CD134 людини на поверхні Т-лімфоцитів людини.

Фігура 2. Експресія CD134 людини на спочиваючих і PHA-M-активованих CD4 Т-лімфоцитах.

Фігура 3. Характеристики зв'язування антитіл миші до CD134 людини - клон АСТ35, клон 12Н3 і клон 20Е5, на поверхні PHA-M-стимульованих Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134.

Фігура 4. Зв'язування антитіл миші до CD134 людини - клон 12Н3 і клон 20Е5, на поверхні PHA-M-стимульованих Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134, CD4 Т-лімфоцити і CD8 Т-лімфоцити.

Фігура 5. Перехресна конкуренція немічених антитіл миші до CD134 людини - клон 12Н3 або клон 20Е5 - з ПЕ-кон'югованими комерційними антитілами миші до CD134 людини - клон АСТ35 або клон L106 на поверхні PHA-M-стимульованих Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134.

Фігура 6. Одночасне зв'язування антитіл миші до CD134 людини - клон 12Н3 або клон 20Е5 - з OX40L людини на поверхні PHA-M-стимульованих Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134.

Фігура 7. Часовий хід ефекту при впливі стимулюючих сфер з антитілами по відношенню до CD3 людини / СВ28 людини на експресію CD134 людини на поверхні ефекторних Т-лімфоцитів людини (Тэфф) і регуляторних Т-лімфоцитів (Трег).

Фігура 8. Залежність "доза-ефект" для впливу антитіл миші до CD134 людини - клон 12H3 або клон 20E5 - або OX40L людини на проліферацію PHA-M-стимульованих Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134.

5 Фігура 9. Ефект комбінації антитіл миші до CD134 людини - клон 12H3 - з OX40L людини, або антитіл миші до CD134 людини - клон 20E5 - з OX40L людини на проліферацію PHA-M-стимульованих Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134.

Фігура 10. Ефект впливу антитіл миші до CD134 людини - клон 12H3 або клон 20E5, або OX40L людини на проліферацію ефекторних Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134, стимульованих стимулюючими сферами з антитілами до CD3 людини / до CB28 людини.

10 Фігура 11. Ефект впливу антитіл миші до CD134 людини - клон 12H3 або клон 20E5, або OX40L людини на проліферацію регуляторних Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134, стимульованих стимулюючими сферами з антитілами до CD3 людини / до CB28 людини.

Фігура 12. Ефект антитіл миші до CD134 людини - клон 12H3 на опосередковану OX40L людини проліферацію ефекторних (А) і регуляторних (В) Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134, стимульованих стимулюючими сферами з антитілами до CD3 людини / до CB28 людини.

Фігура 13. Ефект впливу антитіл миші до CD134 людини - клон 12H3 або клон 20E5, або OX40L людини на супресію проліферації ефекторних Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134, опосередковану регуляторними Т-лімфоцитами людини, що експресують CD134.

20 Фігура 14. Зв'язування химерного антитіла з IgG4к людини і анти-CD134 людини - клон 20E5 - на (мінус і плюс IL-2) поверхні CD4 Т-лімфоцитів і CD8 Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини, стимульованих CD3/CD28 сферами.

Фігура 15. Ефект химерного антитіла з IgG4к людини і анти-CD134 людини - клон 20E5 - або OX40L людини на проліферацію PHA-M-стимульованих Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134.

Фігура 16. Залежність "доза-ефект" для впливу химерного антитіла з IgG4к людини і анти-CD134 людини - клон 20E5 - або OX40L людини на проліферацію PHA-M-стимульованих Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134.

30 Фігура 17. Ефект комбінації химерного антитіла з IgG4к людини і анти-CD134 людини - клон 20E5 - з OX40L людини на проліферацію PHA-M-стимульованих Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134.

Фігура 18. Ефект химерного антитіла з IgG4к людини і анти-CD134 людини - клон 20E5 - або OX40L людини на проліферацію (мінус і плюс IL-2) Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини, стимульованих CD3/CD28 сферами.

35 Фігура 19. Зв'язування антитіл миші до CD134 людини - клони 12H3 і 20E5 - невідновленим і відновленим рекомбінантним білком CD134 людини: Fc $\gamma$  людини. (А) Вивчалися невідновлювальні (а, b) і відновлювальні (с, d) умови. (В) Характер електрофоретичної рухливості рекомбінантного білка CD134 людини: Fc $\gamma$  людини (rhuCD134) при невідновлювальних (а, b) і відновлювальних (с, d) умовах, що визначалися за допомогою забарвлення кумасі діамантовим блакитним. (С) Вестерн-блотинг рекомбінантного білка CD134 людини: Fc $\gamma$  людини в невідновлювальних (а, b) і відновлювальних (с, d) умовах при впливі контрольного антитіла миші - ізотип IgG1к (MlgG1) або антитіл миші до CD134 людини - клони 12H3 і 2E5 (m12H3 і m20E5, відповідно).

40 Фігура 20. Схематичне зображення цистеїн-багатих доменів (CDR) у повнорозмірному CD134 людини (позначений як "CRD1") і в різних процесованих формах CD134 людини (позначені як "CRD2", "CRD3", "CRD4" і "процесований (tc) CDR4").

45 Фігура 21. Зв'язування антитіл миші до CD134 людини - клони 12H3 і 20E5 - на поверхні клітин лінії 293-F, тимчасово трансфікованих конструкцією повнорозмірного CD134 людини (позначений як "CRD1") або конструкціями різних процесованих форм CD134 людини (позначені як "CRD2", "CRD3", "CRD4" і "процесований (tc) CDR4").

50 Фігура 22. Зв'язування химерних антитіл з IgG4к та/або IgG1к людини і анти-CD134 людини - клонів 12H3 і 20E5 - на поверхні клітин лінії 293-F, тимчасово трансфікованих конструкцією повнорозмірного CD134 людини (позначений як "CRD1") або конструкціями різних процесованих форм CD134 людини (позначені як "CRD2", "CRD3", "CRD4" і "процесований (tc) CDR4").

55 Фігура 23. Зв'язування антитіл миші до CD134 людини - клон 12H3 (А) і химерного антитіла з IgG4к та/або IgG1к людини і анти-CD134 людини - клон 12H3 (В) з пептидом, що отриманий з CD134 людини, який відповідає послідовності амінокислот процесованого А1-модуля субдомену CRD3 А1-модуль-CRD4 (відповідно до визначення Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683).

Опис винаходу

Активация Т-лімфоцитів опосередковується не тільки антигенною стимуляцією через рецептори Т-лімфоцитів, але також і ко-стимулюючими сигналами через ко-стимулюючі молекули. Серед декількох ко-стимулюючих молекул ключову роль у виживанні і гомеостазі Т-ефекторів і Т-клітин пам'яті відіграє член сімейства рецепторів фактору некрозу пухлини (TNF) - OX40 (CD134). У відповідності зі сформованими уявленнями про ко-стимуляцію OX40 взаємодія між OX40 і лігандом OX40 (OX40L) виникає, коли активовані Т-лімфоцити зв'язуються з професійними клітинами, що представляють антиген (АПК). Згодом за рахунок ко-стимулюючого сигналу OX40 посилюються функції Т-лімфоцитів, включаючи вироблення цитокінів, експансію і виживання. Взаємодія між OX40 і OX40L виникає під час взаємодії Т-лімфоцитів і дендритних клітин (ДК) - через 2-3 дні після розпізнавання антигену. Т-лімфоцити, що експресують OX40 також можуть взаємодіяти з клітинами, що експресують OX40L, відмінними від ДК, і отримують OX40-сигнал від клітин, які можуть забезпечувати значущі сигнали для генерування Т-клітин пам'яті, посилення відповіді Th2 і збільшення тривалості запальних реакцій. Таким чином, оптимальна взаємодія між OX40 і OX40L може бути сформована у два етапи: OX40L, експресований на поверхні активованих CD4 Т-лімфоцитів, взаємодіє з OX40, експресованими на поверхні інших відповідальних CD4 Т-лімфоцитів, що веде до оптимального генерування CD4 Т-клітин пам'яті (Soroosh et al., 2006), або OX40L, експресований на поверхні CD4+ А-клітинах може запускати виживання Th2-клітин за рахунок взаємодії з OX40 на поверхні Th2-клітин (Kim et al. 2003). Крім того, для розвитку *in vivo* Th2, але не розвитку Th1 вимагається експресія OX40L на поверхні В-лімфоцитів (Linton et al. 2003), і експресуючі OX40L огрядні клітини безпосередньо посилюють функцію Т-ефекторних лімфоцитів за рахунок взаємодії між OX40 на Т-лімфоцитах і OX40L на огрядних клітинах (Kashiwakura et al. J Immunol 2004; 173: 5247-5257; Nakae et al. J Immunol 2006; 176: 2238-2248). Крім того, клітини ендотелію також експресують OX40L (Imura et al. 1996), зв'язування OX40 з клітинами ендотелію може брати участь в судинному запаленні. Надмірні сигнали OX40, як до відповідальних Т-лімфоцитів, так і до регуляторних Т-лімфоцитів, призводять до пригнічення Трег-опосередкованої імуносупресії. Сигнали OX40, що переходять у реактивні Т-лімфоцити, надають їм стійкість до Трег-опосередкованої супресії. З іншого боку, сигнали OX40L, що переходять у Трег-лімфоцити, пригнічують Трег-супресорну функцію, хоча спірним залишається питання про те, чи можуть сигнали OX40 контролювати рівень експресії Foxp3 в Трег-лімфоцитах. Крім того, навмисна стимуляція OX40 призводить до придушення TGF-бета-залежного диференціювання Трег-лімфоцитів (включаючи Трег-лімфоцити). Таке придушення може опосередковуватися частково ефекторними цитокінами, такими як IL-4 і IFN-гама, виробленими ефекторними Т-лімфоцитами, стимульованими OX40. Важливо, що блокування OX40L явно сприяє диференціюванню Трег і викликає толерантність до трансплантату, яка може бути опосередкована Трег-лімфоцитами. Отже, OX40 являється потенційною молекулярною мішенню для контролювання аутоімунітету, опосередкованого Т-лімфоцитами. Крім того, в недавніх дослідженнях повідомлялося, що взаємодія між OX40L, що експресується огрядними клітинами, і OX40, що експресується Трег-клітинами, може взаємно призводити до придушення функції огрядних клітин та супресорної функції Трег (Gri et al. 2008; Piconese et al. 2009).

Для імунологів експериментальною моделлю вибору являються миші, і дослідження їх імунних відповідей внесло колосальний внесок у розуміння роботи імунної системи людини. Загальна структура системи у миші і людини представляється досить близькою; проте також існують значні відмінності. Наприклад, у мишей CD134 експресується Тефф при активації, тоді як Трег постійно експресують CD134 (Piconese et al. J Exp Med 2008; 205: 825-839). У людей CD134 експресується на поверхні як Тефф, так і Трег, але тільки при активації (див. далі, наприклад, Приклад 2 (g)), "Експресія CD134 на поверхні ефекторних та регуляторних Т-лімфоцитів людини після стимуляції стимулюючими сферами з антитілом до CD3 людини/CD28 людини »). Крім того, Трег миші індукують апоптоз Тефф миші, досягаючи супресії (Pandiyan et al. Nat Immunol 2007; 8: 1353; Scheffold et al. Nat Immunol 2007; 8: 1285-1287), тоді як Трег людини не викликає апоптозу Тефф людини, досягаючи супресії (Vercoulen et al. Plos ONE 2009; 4: e7183). У сукупності зазначені дані показують, що роль CD134 у здійсненні супресорної функції Трег в імунній системі людини і миші різна.

Термін "зв'язувальна молекула" включає (1) антитіло, (2) антиген-зв'язувальний фрагмент антитіла і (3) похідну антитіла, згідно з визначенням що наведені у даній заявці. Термін "зв'язується з CD134" або "зв'язування з CD134" відноситься до зв'язування зв'язувальної молекули, згідно з визначенням в цій заявці, з рецептором CD134 в пробі *in vitro*, таким як проба BIAcore або Octet (поверхневий плазмонний резонанс). Переважно зазначена зв'язувальна

молекула має афінність зв'язування ( $K_d$ )  $1 \times 10^{-6}$  м або менше, більш переважно менше  $50 \times 10^{-7}$  м, ще більш переважно менше  $1 \times 10^{-7}$  м.

Термін "ізолюване антитіло" або "ізолююча зв'язувальна молекула" відноситься до антитіла або до зв'язувальної молекули, яка: (1) не зв'язана з асоційованими з нею в природі компонентами, що супроводжують її у природному стані; (2) не містить інших білків того ж виду; (3) експресується клітиною іншого виду; або (4) не існує в природі. Приклади ізолюваних антитіл включають антитіло до CD134, яке піддали афінному очищенню із застосуванням CD134, антитіло до CD134, яке було згенеровано за допомогою гібриду або інших ліній клітин *in vitro*, і антитіло до CD134 людини, отримане в організмі трансгенної тварини.

Термін "агоніст" відноситься до зв'язувальної молекули, згідно з визначенням в цій заявці, яка при зв'язуванні з CD134 (1) стимулює або активує CD134, (2) посилює, сприяє, індукує, підвищує або збільшує час активності, присутності або функції CD134, або (3) посилює, сприяє, збільшує або індукує експресію CD134. Термін "антагоніст" відноситься до зв'язувальної молекули, згідно з визначенням в цій заявці, яка при зв'язуванні з CD134 (1) інгібує або пригнічує CD134, (2) інгібує або пригнічує активність, присутність або функцію CD134, або (3) інгібує або пригнічує експресію CD134.

Термін "антитіло" відноситься до молекули імуноглобуліну, яка зазвичай складається з двох ідентичних пар поліпептидних ланцюгів, причому кожна пара має один "важкий" (H) ланцюг і один "легкий" (L) ланцюг. Легкі ланцюги антитіл людини класифікують на каппа ( $\kappa$ ) і лямбда ( $\lambda$ ). Важкі ланцюги класифікують на мю, дельта, гама, альфа або епсилон, і вони визначають ізотип антитіла - IgM, IgD, IgG, IgA і IgE, відповідно. Кожен важкий ланцюг складається з варіабельної області важкого ланцюга (тут скорочено називається HCVR або VH) і константної області важкого ланцюга. Константні області важкого ланцюга антитіл IgD, IgG і IgA складаються з трьох доменів CH1, CH2 і CH3, а константні області важкого ланцюга IgM і IgE складаються з чотирьох доменів CH1, CH2, CH3 і CH 4. Кожен легкий ланцюг складається з варіабельної області легкого ланцюга (тут скорочено називається LCVR або VL) і константної області легкого ланцюга. Константна область легкого ланцюга складається з одного домену CL. Константні області антитіл можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну з тканинами або факторами організму-хазяїна, включаючи різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини). Області VH і VL можна додатково поділити на гіперваріабельні області, іменовані областями, визначальними комплементарність (CDR), що перемижуються з більш консервативними областями, які називають каркасними областями (FR). Кожна VH і VL складається із трьох CDR і чотирьох FR, розташованих в наступному порядку, з N-кінця до C-кінця: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Зазначені варіабельні області кожної пари важкого/легкого ланцюга (VH і VL), відповідно, утворюють зв'язуючий сайт антитіла. Співвідношення амінокислот з кожною областю або доменом відбувається відповідно з визначенням у публікації Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 і 1991)) або відповідно з визначенням у публікації Chothia et al. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions (Nature 1989; 342(6252):877-83). Термін "антитіло" включає антитіло, яке являється мультимірною формою антитіла, такою як димери, тримери або мультимери вищого порядку. Він також включає антитіло, яке пов'язане або приєднане до фрагменту - не антитіло. Крім того, термін "антитіло" не обмежується будь-яким конкретним способом отримання зазначеного антитіла. Наприклад, він включає моноклональні антитіла, рекомбінантні антитіла і поліклональні антитіла.

Термін "похідне антитіло" або "похідне" антитіла відноситься до молекули, яка здатна зв'язуватися з тим же антигеном (тобто, CD134 людини), з яким зв'язується антитіло, і включає послідовність амінокислот зазначеного антитіла, пов'язаного з додатковим молекулярним фрагментом. Послідовність амінокислот антитіла, яка міститься в похідній зазначеного антитіла, може бути повнорозмірним антитілом або може бути частиною або частинами повнорозмірного антитіла. Зазначений додатковий молекулярний фрагмент може бути біологічною або хімічною молекулою. Приклади додаткових молекулярних фрагментів включають хімічні групи, пептиди, білки (такі як ферменти, антитіла), амінокислоти і хімічні сполуки. Зазначений додатковий молекулярний фрагмент може бути призначений для застосування в якості агента для детекції, мітки-маркера, терапевтичного або фармацевтичного агента. Послідовність амінокислот в антитілі може бути приєднана або пов'язана з додатковим фрагментом нековалентним зв'язком, хімічним зв'язком, шляхом генетичного злиття або іншим шляхом. Термін "похідне антитіло" також включає химерні антитіла, гуманізовані антитіла і молекули, які отримані на основі модифікацій послідовностей амінокислот антитіла CD134, таких як консервативні заміни, вставки і додавання амінокислот.

Термін "антиген-зв'язувальний фрагмент" антитіла відноситься до однієї або більше частин повнорозмірного антитіла, які зберігають здатність до зв'язування з тим же антигеном (тобто, CD134 людини), з яким зв'язується вказане антитіло. Також термін "антиген-зв'язувальний фрагмент" включає частину антитіла, яка являється частиною більш великої молекули, утвореної за рахунок ковалентної чи нековалентно взаємодії, або частину антитіла з одним або більше додатковими молекулярними фрагментами. Приклади додаткових молекулярних компонентів включають амінокислоти, пептиди або білки, такі як центральна область стрептавідину, яку можна застосовувати для отримання тетрамірної молекули scFv (Kipriyanov et al. Hum Antibodies Hybridomas 1995; 6(3): 93-101).

Термін "химерне антитіло" відноситься до антитіла, що містить послідовності амінокислот, що отримані з двох або більше антитіл. Зазначені два або більше антитіл можуть бути з одного і того ж виду або з двох або більше різних видів.

Термін "епітоп" відноситься до частини антигену, який здатний специфічно зв'язуватися з антитілом або рецептором Т-лімфоцитів, або іншим чином взаємодіяти з молекулою. "Епітоп" також у техніці називають "антигенними детермінантом". Як правило, епітоп складається з хімічно активних поверхневих угруповань молекул, таких як амінокислоти або бічні ланцюги вуглеводів або цукрів. Епітоп може бути "лінійним" або "нелінійним/конформаційним". Після того, як визначено бажаний епітоп (наприклад, за допомогою картування епітопів), можна згенерувати антитіло до зазначеного епітопу. Генерування та опис властивостей антитіл також може дати інформацію про бажані епітопи. На підставі такої інформації потім можливо провести скринінг антитіл, щоб відібрати ті антитіла, які зв'язуються з одним і тим же епітопом, тобто шляхом проведення досліджень перехресного конкурування з метою пошуку антитіл, які конкурують за зв'язування один з одним, тобто, антитіла конкурують за зв'язування з антигеном.

Термін "клітина-хазяїн" відноситься до клітини, в яку був введений вектор експресії. Зазначений термін включає не тільки клітину конкретного суб'єкта, але також і потомство такої клітини. Оскільки в наступних поколіннях можуть виникати певні модифікації або у зв'язку із впливом навколишнього середовища, або у зв'язку з мутаціями, таке потомство може бути не ідентичним до батьківської клітини, але все ж включено в термін "клітина-хазяїн".

Термін "антитіло людини" відноситься до антитіла, що складається з послідовностей амінокислот тільки з послідовностей імуноглобулінів людини. Антитіло людини може містити ланцюги вуглеводів з антитіла миші, якщо його отримують в організмі миші, в клітинах миші або в клітинах гібридоми, отриманої з клітин миші. Антитіла людини можна отримати різними способами, відомими в техніці.

Термін "гуманізоване антитіло" відноситься до химерних антитіл, які містять амінокислотні залишки, що отримані з послідовностей антитіла людини. Гуманізоване антитіло може містити деякі або всі CDR з тваринного антитіла, яке не є людиною в той час як структура і константні області зазначеного антитіла містять залишки амінокислот, що отримані з послідовностей антитіла людини.

Термін "ссавець" відноситься до будь-якого виду тварин з класу ссавців. Приклади ссавців включають: людину; лабораторних тварин, таких як щури, миші, мавпи і морські свинки; домашніх тварин, таких як кролики, корови, вівці, кішки, собаки, коні і свині, і т.п.

Термін "ізольована нуклеїнова кислота" відноситься до молекули нуклеїнової кислоти геномного походження, з кДНК або синтетичного походження, або їх поєднання, яка відокремлена від інших молекул нуклеїнових кислот, присутніх в природному джерелі зазначеної нуклеїнової кислоти. Переважно, "ізольована" нуклеїнова кислота не містить послідовностей, розташованих на 5' і 3'- кінцях розглянутої нуклеїнової кислоти в геномній ДНК організму, з якого була отримана дана нуклеїнова кислота.

Термін "швидкість дисоціації" або " $K_d$ " відноситься до рівноважної константи дисоціації взаємодії конкретного антитіла-антигену і застосовується для опису спорідненості зв'язування між лігандом (таким як антитіло) і білком (таким як CD134). Чим менше рівноважна константа дисоціації, тим більш міцно зв'язується ліганд, або вище спорідненість між лігандом і білком.  $K_d$  можливо виміряти за допомогою поверхневого плазмонного резонансу, наприклад, із застосуванням системи BIACORE 1 або Octet. Термін "антитіло до CD134" відноситься до антитіла, згідно з визначенням в цій заявці, здатному до зв'язування з CD134 людини.

Терміни "рецептор OX40" і "рецептор CD134" в даній заявці являються взаємозамінними, і вони включають CD134 людини, а також його варіанти, ізоформи і гомологи видів. Відповідно зв'язувальні молекули людини, що розкриваються в даній заявці, в певних випадках також можуть зв'язуватися з CD134 видами, що відмінні від людини. В інших випадках зв'язувальні молекули можуть бути абсолютно специфічні відносно CD134 людини і можуть не проявляти

видову перехресну реактивність або перехресну реактивність іншого типу. Зокрема, вони не будуть зв'язуватися з CD134 миші або щурів.

Термін "специфічно зв'язується з CD134 людини" позначає, що  $K_d$  зв'язувальної молекули відносно зв'язування з CD134 людини, переважно більше ніж у 10, більш ніж у 50, більш ніж або, найбільш переважно, більш ніж у 100 разів перевищує  $K_d$  для зв'язування, наприклад, з CD40 людини, що визначають за допомогою проби, що описана в даній заявці, або є відомою фахівцям у даній галузі техніки (наприклад, проба BIAcore). Визначення того, що конкретний агент специфічно зв'язується з рецептором OX40, можуть бути легко отримані альтернативно за допомогою стандартних процедур або за допомогою їх адаптації. Одна відповідна для аналізу проба *in vitro* заснована на процедурі Вестерн-блотингу (що описана у багатьох стандартних посібниках, включаючи "Antibodies, A Laboratory Manual" Harlow and Lane). Щоб визначити, що певний агент, що зв'язується з рецептором OX40, специфічно зв'язується з білком OX40 людини, весь білок клітини екстрагують з клітин ссавців, що не експресують антиген OX40, таких як клітини, відмінні від лімфоцитів (наприклад, клітини COS або CHO), трансформованих із застосуванням молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує OX40. В якості негативного контролю з відповідних нетрансформованих клітин також екстрагують весь білок клітин. Далі зазначені препарати білка піддають електрофорезу на денатуруючому або неденатуруючому поліакриламідному гелі (PAGE). Згодом зазначені білки переносять на мембрану (наприклад, з нітроцелюлози) за допомогою Вестерн-блотингу, і агент, який потрібно тестувати, інкубують на зазначеній мембрані. Після промивання мембрани з метою видалення агента що неспецифічно зв'язався, наявність агента що зв'язався визначають із застосуванням антитіла, спрямованого на тестований агент, кон'югованого з агентом для детекції, таким як фермент лужної фосфатази; внесення субстрату 5-бром-4-хлор-3-індоліл-фосфату/нітро-синього тетразолію призводить до отримання щільного синього з'єднання за рахунок імулокалізованої лужної фосфатази. За допомогою даного способу було показано, що агенти, які специфічно зв'язуються з OX40 людини, зв'язуються з областю OX40 людини (яка повинна бути локалізована в заданому положенні гелю, що визначається за його молекулярною масою) в екстракті з клітин, трансформованих OX40, тоді як в екстракті з нетрансформованих клітин спостерігалася низька ступінь зв'язування або його відсутність. Може виникати неспецифічне зв'язування агента з іншими білками, і воно може визначатися як слабкий сигнал на Вестерн-блотингу. Неспецифічна природа такого зв'язування може бути виявлена фахівцями в даній області техніки по слабкому сигналу, що надходить на Вестерн-блотинг, у порівнянні з сильним основним сигналом, що виникає внаслідок специфічного зв'язування агента/білка OX40 людини. В ідеальному випадку, агент, що зв'язується з рецептором, не повинен зв'язуватися з білком, екстрагованим з нетрансформованих клітин.

Крім аналізу зв'язування із застосуванням екстрагованих білків передбачувані агенти, що зв'язуються з рецептором OX40 які можна тестувати з метою підтвердження їх здатності до зв'язування по суті тільки з рецептором OX40 *in vivo* шляхом кон'югації зазначеного агента з флуоресцентною міткою (такою як флуоресцеїн ізотіонат (FITC)) та аналізу його зв'язування з популяціями антиген-активованих CD4+Т-лімфоцитів і неактивованих Т-лімоцитів за допомогою сортування клітин з порушенням флуоресценції (FACS). Агент, який зв'язується по суті тільки з рецептором OX40, може забарвлювати тільки активовані CD4+Т-лімфоцити.

Термін "вектор" в цій заявці відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, здатної транспортувати іншу молекулу нуклеїнової кислоти в клітину-хазяїн. Приклади векторів включають плазміди, вектори на основі вірусів, косміди або вектори-фаги, а також вектори на основі оголеної ДНК або РНК. Деякі вектори здатні до автономної реплікації в клітині-хазяїні, в яку вони були введені. Деякі вектори можуть інтегруватися в геном клітини-хазяїна при введенні їх в клітину-хазяїн, і в результаті вони реплікуються разом з геномом хазяїна. Певні вектори здатні управляти експресією генів, з якими вони функціонально пов'язані, і, отже, вони можуть називатися "векторами експресії".

У даній заявці двадцять традиційних амінокислот та їх скорочення позначаються згідно із загальноприйнятим вживанням.

Згідно з даним винаходом запропоновані зв'язувальні молекули, які зв'язуються з CD134 людини, включаючи анти-CD134 антитіла, антиген-зв'язувальні фрагменти анти-CD134 антитіл і похідні анти-CD134 антитіл. Зазначені зв'язувальні молекули характеризуються щонайменше однією з наступних функціональних властивостей: (а) зв'язуються з CD134 людини з  $K_d$   $1 \times 10^{-6}$  м або менше і (b) не перешкоджають зв'язуванню рецептора CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 (OX40L); (c) володіють агоністичною активністю щодо CD134 людини на ефекторних Т-клітинах та/або антагоністичною активністю щодо CD134 людини на регуляторних Т-клітинах; (d) не зв'язуються з рецептором CD40 при концентрації до 500 нм; (e) не зв'язуються з

рецептором CD 137 при концентрації до 500 нм; (f) зв'язуються з рецептором CD271 при концентрації до 500 нм; (g) здатні підсилювати вироблення IL-2 ізольованими Т-лімфоцитами людини; (h) здатні підсилювати імунну відповідь; (i) здатні пригнічувати ріст клітин пухлини; і (j) надають терапевтичну дію при раку. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначена зв'язувальна молекула зв'язується з CD134 людини з  $K_d$   $1 \times 10^{-7}$  м або менше,  $K_d$   $1 \times 10^{-8}$  м або менше або  $1 \times 10^{-9}$  м або менше.

Антитіла та інші зв'язувальні молекули відповідно до даного винаходу можна отримати за допомогою стандартних способів, і потім проводити скринінг з метою виявлення та отримання зв'язувальних молекул, які не перешкоджають зв'язуванню OX40L з CD134. Наприклад, можна відбирати зв'язувальні молекули, які зв'язуються з CD134, навіть коли CD134 був підданий впливу насичуючої концентрації OX40L.

Згідно з одним варіантом реалізації даного винаходу запропоновано антитіло людини, яке зв'язується з CD134 людини. Згідно з деякими варіантами реалізації вказане антитіло людини являється моноклональним антитілом, яке специфічно зв'язується з CD134 людини з  $K_d$  100 нм або менше, переважно 10 нмоль або менше, та/або володіє агоністичною активністю щодо CD134 людини на поверхні Т-ефекторних клітин та/або антагоністичною активністю щодо CD134 людини на поверхні Т-регуляторних клітин. Одним прикладом таких антитіл людини являється клон 12H3 моноклональних антитіл людини. Послідовність амінокислот цілої варіабельної області важкого ланцюга і послідовності амінокислот трьох CDR варіабельної області важкого ланцюга (VH) клону 12H3 антитіла наведені під номерами SEQ ID №:12 і 14-16, відповідно. Послідовність амінокислот цілої варіабельної області легкого ланцюга і послідовності амінокислот трьох CDR варіабельної області легкого ланцюга (VL) клону 12H3 антитіла наведені під номерами SEQ ID №:13 і 17-19, відповідно. Іншим ілюстративним антитілом згідно з даним винаходом являється клон 20E5 моноклонального антитіла людини. Послідовність амінокислот цілої варіабельної області важкого ланцюга і послідовності амінокислот трьох CDR варіабельної області важкого ланцюга (VH) клону 20E5 антитіла наведені під номерами SEQ ID №:4 і 6-8, відповідно. Послідовність амінокислот цілої варіабельної області легкого ланцюга і послідовності амінокислот трьох CDR варіабельної області легкого ланцюга (VL) клону 20E5 антитіла наведені під номерами SEQ ID №:5 і 9-11, відповідно.

Антитіла згідно з даним винаходом можуть містити одну або більше із зазначених CDR або одну або більше із зазначених CDR з 1, 2 або 3 замінами амінокислот на одну CDR. Такі заміни переважно являються "консервативними" замінами. Консервативні заміни, при яких забезпечується функціональна схожість амінокислот, добре відомі в техніці і описані, наприклад, у Таблиці 1 в WO 2010/019702, яка включена в дану заявку за допомогою посилання.

За умови, що клон 12H3 і клон 20E5 зв'язуються з CD134 людини, послідовності VH і VL кожного з них можна "поєднувати і комбінувати" з іншими антитілами до CD134, утворюючи додаткові антитіла. Зв'язування таких "поєднаних і комбінованих" антитіл до CD134 людини можна тестувати із застосуванням аналізу зв'язування, відомого в техніці, включаючи аналіз, описаний в розділі "Приклади". В одному випадку, коли області VH і VL поєднують і комбінують, послідовність VH з конкретної пари VH/VL замінують на послідовність структурно схожої VH. Аналогічно, в іншому випадку послідовність VL з конкретної пари VH/VL замінують на послідовність структурно схожої VL.

Молекули, що містять тільки одну з трьох областей CDR (у деяких випадках, навіть тільки одну CDR або її частину, особливо CDR3), здатні зберігати антиген-зв'язувальну активність антитіла, з якого була отримана дана CDR. Див, наприклад, Laune et al. JBC 1997; 272: 30937-44; Monnet et al. JBC 1999; 274:3789-96; Qiu et al. Nature Biotechnology 2007; 25: 921-9; Ladner et al. Nature Biotechnology 2007; 25: 875-7; Heap et al. J Gen Virol 2005; 86: 1791-1800; Nicaise et al. Protein Science 2004; 13: 1882-91; Vaughan and Sollazzo Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening 2001; 4:417-430; Quijcho Nature 1993; 362: 293-4; Pessi et al. Nature 1993; 362: 367-9; Bianchi et al. J Mol Biol 1994; 236: 649-59; and Gao et al. J Biol Chem 1994; 269: 32389-93.

Відповідно, одним варіантом реалізації даного винаходу являється антитіло до CD134 людини, яке містить: (a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот відповідно SEQ ID №:12; (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:13.

Згідно з додатковим варіантом реалізації даного винаходу запропонована ізольована молекула, що зв'язується з CD134, яка містить (a) CDR1 важкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:14; та/або (b) CDR2 важкого ланцюга, що

містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:15; та/або (c) CDR3 важкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:16.

5 Згідно з додатковим варіантом реалізації даного винаходу запропонована ізольована молекула, що зв'язуються з CD134, яка містить (a) CDR1 легкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:14; та/або (b) CDR2 легкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:15; та/або (c) CDR3 легкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:16.

10 Відповідно, з одним варіантом реалізації до даного винаходу являється ізольоване антитіло до CD134 людини, яке містить: (a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:4; (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:5.

15 Згідно з додатковим варіантом реалізації даного винаходу запропонована ізольована молекула, що зв'язуються з CD134, яка містить (a) CDR1 важкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:6; та/або (b) CDR2 важкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:7; та/або (c) CDR3 важкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:8.

20 Згідно з додатковим варіантом реалізації даного винаходу запропонована ізольована молекула, що зв'язуються з CD134, яка містить (a) CDR1 легкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:9; та/або (b) CDR2 легкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:10; та/або (c) CDR3 легкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот у відповідності з SEQ ID №:11.

25 За умови, що клон 12H3 і клон 20E5 зв'язуються з CD134 людини, і антиген-зв'язувальну специфічність забезпечують головним чином області CDR1, CDR2 і CDR3, послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 VH і послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 VL можна "поєднувати і комбінувати" з отриманням додаткових антитіл. Наприклад, CDR з різних антитіл до CD134 можна поєднувати і комбінувати, хоча кожне антитіло зазвичай містить CDR1, CDR2 і CDR3 VH і CDR1, CDR2 і CDR3 VL. Зв'язування таких "поєднаних і комбінованих" антитіл до CD134 людини можна тестувати із застосуванням аналізу зв'язування, відомого в техніці, включаючи аналіз, що описаний в розділі "Приклади" (наприклад, ELISA, аналіз "Biacore"). В одному випадку, коли поєднують і комбінують CDR VH, послідовність CDR1, CDR2 та/або CDR3 з послідовності конкретного VH замінюють на послідовність(ності) структурно схожої CDR. Аналогічно, коли поєднують і комбінують CDR VH, послідовність CDR1, CDR2 та/або CDR3 з послідовності конкретного VL зазвичай заміняють на послідовність(ності) структурно схожої CDR. Фахівцям в даній галузі техніки повинно бути очевидно, що нові послідовності VH і VL можна створювати шляхом заміни однієї або більшої області CDR VH та/або VL на структурно подібні послідовності з послідовності CDR, що розкриваються в даній заявці.

30 Клас (наприклад, IgG, IgM, IgE, IgA або IgD) і підклас (наприклад, IgG1, IgG 2, IgG 3 або IgG4) антитіл до CD134 можна визначити за допомогою відповідних способів, таких як ELISA або Вестерн-блотинг, а також за допомогою інших технологій. В якості альтернативи, клас і підклас можна визначити за допомогою секвенування всіх або частини константних доменів важких та/або легких ланцюгів зазначених антитіл, порівнюючи їх послідовності амінокислот з послідовностями амінокислот відомих імуноглобулінів різних класів і підкласів та визначаючи клас і підклас зазначених антитіл. Антитіла до CD134 можуть бути молекулою IgG, IgM, IgE, IgA або IgD. Наприклад, антитіла до CD134 можуть відноситися до IgG з підкласу IgG1, IgG 2, IgG 3 або IgG4. Таким чином, згідно з іншим аспектом даного винаходу запропоновано спосіб перетворення антитіла до CD134 певного класу або підкласу в антитіло іншого класу або підкласу.

40 Зв'язувальні молекули відповідно до одного варіанту реалізації даного винаходу включають моноклональні антитіла, їх фрагменти, пептиди та інші хімічні групи. Моноклональні антитіла можна отримати за допомогою стандартного способу імунізації ссавця, після якої проводять виділення плазматичних D-лімфоцитів, що виробляють аналізовані моноклональні антитіла і злиття їх з клітинами мієломи.

50 Згідно з різними варіантами реалізації зв'язуючий фрагмент може бути не справжнім антитілом, а міметиком антитіла (наприклад, на підставі каркасу, що не походить з антитіла), аптамерами РНК, малою молекулою або CovX-тілом.

55 Слід розуміти, що міметики антитіл (наприклад, структури каркасу, що не походять з антитіла, що володіють високою стабільністю, при цьому допускаючи введення варіабельності в певні положення) можна застосовувати для створення молекулярних бібліотек, з яких можна отримувати зв'язуючі фрагменти. Фахівці в галузі біохімії повинні бути знайомі з багатьма

такими молекулами. Такі молекули можна застосовувати в якості зв'язуючого фрагменту в агенті відповідно до даного винаходу.

Приклади міметиків антитіл обговорюються у Skerra et al. (2007, Curr. Opin. Biotech., 18: 295-304) і включають: білки-міметики антитіл компанії "Affibody" (також звані тринектинами; Nygren, 2008, FEBS J, 275, 2668-2676); CTLD (лектиноподібний домен C-типу) (також звані; InnovationsPharmac. Technol. (2006), 27-30); аднектини (також звані монотілами; Meth. Mol. Biol., 352 (2007), 95-109); антикаліни (Drug Discovery Today (2005), 10, 23-33); DAR-шпильки (анкирини; Nat. Biotechnol. (2004), 22, 575-582); авімери (Nat. Biotechnol. (2005), 23, 1556-1561); мікротіла (FEBS J, (2007), 274, 86-95); аптамери пептидів (Expert. Opin. Biol. Ther. (2005), 5, 783-797); домени Куниця (J. Pharmacol. Exp. Ther. (2006) 318, 803-809); афіліни (Trends. Biotechnol. (2005), 23, 514-522).

Відповідно, переважно, щоб міметик антитіла був вибраний з групи, що включає або складається з білків-міметиків антитіл компанії "Affibody", тетранектинів (CTLD), аднектинів (монотіл), антикалінів, DAR-шпильок (анкиринів), авімерів, iM-антитіл, мікротіл, аптамерів пептидів, доменів Куниця, аптамерів і афілінів.

Під "малими молекулами" мається на увазі низкомолекулярна органічна сполука масою 900 Дальтон або менше. Хоча великі біополімери, такі як нуклеїнові кислоти, білки і полісахариди (такі як крохмаль або целюлоза) не включені в поняття "малі молекули", складові їх мономер (рибо - або дезоксирибонуклеотиди, амінокислоти і моносахариди, відповідно) і олігомери (тобто, короткі полімери, такі як динуклеотид, пептиди, такі як антиоксидант глутатіон, і дисахариди, такі як сахароза) включені в дане поняття. Отримання малих молекул описано у Mayes & Whitcombe, 2005, Adv. Drug Deliv. Rev. 57:1742-78 and Root-Bernstein & Dillon, 2008, Curr. Pharm. Des. 14:55-6. 2. CovX-тіла створюють шляхом ковалентного з'єднання фармакофору через лінкер зі зв'язувальним сайтом специфічно сконструйованого антитіла, що призводить до ефективного перепрограмування зазначеного антитіла (Tryder et al., 2007, Bioorg. Med. Chem. Lett., 17: 501-6). В результаті одержують новий клас хімічних фрагментів, який утворюється, коли кожен компонент вносить бажані ознаки в інтактне CovX-тіло - зокрема, такий фрагмент володіє біологічною активністю, характерною для пептиду, і збільшеним часом напіввиведення, характерним для антитіла.

Антитіла людини можна отримати кількома різними способами, включаючи застосування бібліотеки експресованих послідовностей імуноглобулінів людини (Stratagene Corp., La Jolla, California; Cambridge Antibody Technology Ltd., London, England) для отримання фрагментів антитіла людини (VH, VL, Fv, Fd, Fab або (Fab')<sub>2</sub>) та застосування зазначених фрагментів для конструювання повного антитіла людини шляхом з'єднання з ним відповідної частини, із застосуванням технологій, схожих з технологіями отримання химерних антитіл. Антитіла людини також можна отримати у трансгенних мишей з імуноглобуліном людини в геномі. Таких мишей можна придбати, наприклад, у компанії "Abgenix, Inc.", Фремонт, Каліфорнія і "Medarex, Inc.", Аннандал, Нью-Джерсі. Крім з'єднання областей Fv важкого і легкого ланцюга з утворенням одноланцюжкового пептиду, аналогічними способами можна конструювати і експресувати Fab (M.J. Evans et al. J Immunol Meth 1995; 184: 123-138).

Антитіла DeImmunized™ (деімунізовані антитіла) являють собою антитіла, в яких були виключені потенційно імуногенні епітопи Т-лімфоцитів, які описані в заявці на Міжнародний патент PCT/GB98/01473. Отже, очікується, що імуногенність у людей буде виключена або істотно знижена, коли такі антитіла будуть застосовувати in vivo. Такими способами можуть бути виключені свої імуногенні епітопи Т-лімфоцитів (якщо такі мають місце бути) в зв'язувальних молекулах на основі імуноглобулінів.

Всі повністю і частково людські антитіла, що описані вище, менш імуногенні, ніж повністю мишачі антитіла, або антитіла, що отримані від людини, як і фрагменти, і одноланцюгові антитіла. Всі зазначені молекули (або їх похідні), відповідно, з меншою ймовірністю викликають імунну або алергічну реакцію. Отже, вони більше підходять для введення людям in vivo, ніж повністю нелюдські антитіла, особливо, коли необхідно повторне або тривале введення.

Біспецифічні антитіла можна застосовувати в якості агентів для перехресної зшивки між CD134 людини однієї і тієї ж клітини-мішені людини або CD134 людини на двох різних клітинах-мішенях людини. Такі біспецифічні антитіла володіють однією специфічністю до кожного з двох різних епітопів на CD134 людини. Зазначені антитіла і спосіб їх отримання описані в Патенті США № 5,534,254 (Creative Biomolecules, Inc.). Різні варіанти реалізації біспецифічних антитіл, описані у вказаному патенті, включають зшивку одноланцюжкового Fv з пептидними зшиваючими агентами, включаючи Ser-Cys, (Gly)<sub>4</sub>-Cys, (His)<sub>6</sub>-(Gly)<sub>4</sub>-Cys, хелатуючі агенти і хімічні або дисульфідні зшивання, включаючи бісмалеїмідгексан і бісмалеїмідкапроїл.

Молекули, що відмінні від антитіл, можна або виділяти або шляхом скринінгу вибирати з бібліотек сполук традиційними способами. Автоматизована система для генерування та скринінгу бібліотеки сполук описана в Патентах США № 5,901,069 і 5,463,564. Більш сфокусований підхід має на увазі тривимірне моделювання сайту зв'язування та подальше

5 отримання сімейства молекул, які задовольняють моделі. Потім їх піддають скринінгу з метою відбору молекул з оптимальними характеристиками зв'язування.

Інший підхід полягає в генеруванні бібліотеки рекомбінантних пептидів і подальшому їх скринінгу з метою відбору пептидів, які зв'язуються з розглянутим епітопом CD134 людини. Див, наприклад, Патент США № 5,723,322. Даний епітоп - той самий, що зв'язується з

10 моноклональними антитілами, описаними в прикладах далі. Фактично молекули можна згенерувати або виділити відносно легко відповідно до технологій, добре відомими в техніці, коли епітоп відомий.

Згідно з додатковими варіантами реалізації запропоновані похідні будь-якого з антитіл до CD134 людини, описаних вище. Згідно одному конкретному аспекту похідну зазначеного антитіла отримують на підставі модифікацій послідовностей амінокислот клону 12H3 та/або клону 20E5. Послідовності амінокислот будь-яких областей ланцюгів антитіла можна модифікувати, наприклад, каркасні області, області CDR або константні області. Зазначені модифікації можна вводити за допомогою стандартних технологій, відомих в техніці, таких як сайт-направлений мутагенез і випадковий ПЛР-опосередкований мутагенез, і вони можуть

20 включати природні, а також неприродні амінокислоти. Типи модифікацій включають вставки, делеції, заміни або їх поєднання, однієї або більше амінокислот антитіла до CD134. Згідно з деякими варіантами реалізації похідна антитіла містить 1, 2, 3 або 4 заміни амінокислот у CDR важкого ланцюга та/або одну заміну амінокислоти в CDR легкого ланцюга. Згідно з деякими варіантами реалізації похідна антитіла до CD134 містить одну або більше замін амінокислот в порівнянні з послідовністю амінокислот в послідовності генів людини ембріонального типу. Згідно конкретного варіанту реалізації одна або більше із зазначених замін у порівнянні з послідовністю ембріонального типу знаходяться в області CDR2 важкого ланцюга. Відповідно до іншого конкретного варіанту реалізації заміни амінокислот відносно послідовності ембріонального типу знаходяться в одному або більше положеннях, що збігаються з

30 положеннями замін відносно послідовності ембріонального типу в антитілах клону 12H3 та/або клону 20E5. Згідно ще одному варіанту реалізації заміна амінокислот являється заміною одного або більше цистеїну в антитілі на другий залишок, наприклад, без обмежень аланін або серин. Цистеїн може бути канонічним або неканонічним цистеїном. Заміна може бути зроблена в CDR або в каркасній області варіабельного домену або в константному домені антитіла. Іншим типом заміни амінокислот являється виключення пар аспарагін-гліцин, які утворюють потенційні сайти дезамінування, шляхом заміни одного або більше із зазначених залишків. Ще в інших варіантах реалізації заміна амінокислоти являється консервативною заміною амінокислоти. Згідно з одним варіантом реалізації похідна антитіла містить 1, 2, 3 або 4 таких що йдуть підряд консервативних амінокислот в областях CDR важких ланцюгів у порівнянні з послідовностями амінокислот в клоні 12H3 та/або клоні 20E5. Іншим типом модифікацій антитіла до CD134 людини являється зміна вихідного характеру глікозилювання антитіла. Термін "зміна" відноситься до делеції одного або більше вуглеводних фрагментів, які виявляються в антитілі та/або до додавання одного або більше сайтів глікозилювання, які не присутні в зазначеному антитілі.

45 Глікозильоване антитіло звичайно N-приєднане. "N-приєднане" означає приєднання вуглеводного фрагмента до бічного ланцюга залишку аспарагіну. Приклади інших модифікацій включають ацилювання, амідування, ацетилювання, поперечне зшивання, циклізацію, формілювання, гідроксилування, йодування, метилювання, міристинування, утворення дисульфідних зв'язків, деметилювання, утворення ковалентних поперечних зшивок, утворення цистеїну, окислення, фосфорилювання, пренилювання, пегілювання, протеолітичний процесинг і сульфатації.

Згідно з додатковим варіантом реалізації запропоновано похідну антитіла, яка містить антитіло до CD134, або його антиген зв'язуючий фрагмент, що описані в даній заявці, що пов'язані з додатковим молекулярним фрагментом. Приклади додаткових молекулярних

55 фрагментів включають фармацевтичні агенти, пептиди або білки, а також агенти для детекції або мітки. Специфічні приклади фармацевтичних агентів, які можна з'єднувати з антитілом до CD134, включають цитотоксичні агенти або інші протипухлинні агенти, а також радіоактивні ізотопи. Специфічні приклади пептидів або білків, які можна з'єднувати з антитілом до CD134, включають антитіла, які можуть бути тими самими антитілами до CD134, або іншими антитілами. Специфічні приклади агентів для детекції або міток, які можна з'єднувати з

60

антитілами до CD134, включають (1) флуоресцентні сполуки, такі як флуоресцеїн, флуоресцеїн ізотіоціанат, фікоеритрин, родамін, 5-диметиламін-1-нафталенсульфонілу хлорид і люмінофор на основі комплексів лантанидів; (2) ферменти, такі як пероксидаза хрому, лужна фосфатаза, люцифераза і глюкозооксидаза; (3) біотин; (4) заздалегідь заданий поліпептидний епітоп, який розпізнається вторинним репортером, такий як парні послідовності лейцинової "блискавки", метал-зв'язуючі домени, епітопні мітки і сайти зв'язування для вторинних антитіл. Згідно з додатковим варіантом реалізації запропоновано похідну антитіла, яка являється мультимірною формою антитіла до CD134, такою як димери, тримери антитіл і мультимери антитіл більш високого порядку або мономерні антитіла. Окремі мономерні в мультимірному антитілі можуть бути ідентичні або різні, тобто вони можуть бути геретомірними або гомомірними мультимерами антитіл. Мультимерізацію антитіл можна досягти за допомогою природної агрегації. Наприклад, деякий відсоток очищених препаратів антитіл (наприклад, очищені молекули IgG1) спонтанно утворюють агрегати білків, що містять гомодимери антитіл та інші мультимери антитіл більш високого порядку. В якості альтернативи гомодимери антитіл можна сформувати за допомогою технологій хімічної сполуки, відомих в техніці. Відповідні зшиваючі засоби включають засоби, які являються гетеробіфункціональними, такими як m-малеїмідобензоїл-N-гідроксисукцинімідний ефір, N-сукцинімідил S-ацетіоацетат і сукцинімідил-4-(малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат) або гомобіфункціональними (такими як дисукцинілімідил-суберат). Такі лінкери є у продажу. Також можна викликати мультимерізацію антитіл за допомогою технологій рекомбінантних ДНК, відомих в техніці.

Згідно ще одному додатковому варіанту реалізації запропоновано похідну антитіла, яка являється химерним антитілом, що містить послідовність амінокислот антитіла до CD134 людини, описаного в даній заявці вище. Відповідно до іншого прикладу всі CDR химерного антитіла отримані з антитіл до CD134 людини. Відповідно до іншого прикладу в химерному антитілі поєднують CDR з більш ніж одним антитілом до CD134 людини. Також химерне антитіло може містити каркасні області, отримані з одного антитіла до CD134 людини і одну або більше CDR з одного або більше інших антитіл людини. Химерні антитіла можна згенерувати за допомогою стандартних способів, відомих в техніці. Згідно з деякими іншим конкретним варіантам реалізації зазначені химерні антитіла містять одну, дві або три CDR з варіабельної області важкого ланцюга або з варіабельної області легкого ланцюга антитіла, вибраного з антитіл клону 12H3 та/або клону 20E5.

Приклади інших похідних антитіл, запропонованих відповідно до даного винаходу, включають одноланцюгові антитіла, діатіла, доменні антитіла, нанотіла і унітіла. Згідно з переважним варіантам реалізації зазначеними моноклональними антитілами можуть бути химерні антитіла, гуманізовані антитіла, антитіла людини, антитіла DelImmunized™, одноланцюгові антитіла, фрагменти, включаючи Fab, F(ab')<sub>2</sub> Fv або інші фрагменти, які зберігають антиген-зв'язувальну функцію вихідного антитіла. Одноланцюгові антитіла ("ScFv") і спосіб їх отримання описаний в патенті США № 4,946,778.

"Одноланцюгове антитіло" (scFv) складається з одного поліпептидного ланцюга, що містить домен VL, з'єднаний з доменом VH, причому домен VL і домен VH спаровуються, утворюючи при цьому одновалентну молекулу. Одноланцюгове антитіло можна отримати у відповідності зі способом, відомим в техніці (див., наприклад, Bird et al., (1988) Science 242:423-426 and Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). "Діатіло" складається з двох ланцюгів, причому кожен ланцюг складається з варіабельного домену важкого ланцюга, з'єднаного з варіабельним доменом легкого ланцюга на тому й самому поліпептидному ланцюзі, з'єднаного коротким пептидним лінкером, причому зазначені дві області на одному й тому самому ланцюзі не спаровуються один з одним, а спаровуються з комплементарними доменами на другому ланцюгу, утворюючи біспецифічну молекулу. Способи отримання діатіл відоми в техніці (див., наприклад, Holliger P. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 и Poljak R. J. et al., (1994) Structure 2:1121-1123). Доменні антитіла (dAb) представляють собою маленькі функціональні зв'язуючі одиниці антитіл, відповідні до варіабельним областям або важких, або легких ланцюгів антитіл. Доменні антитіла можна легко експресувати в системах на основі бактерій, дріжджів і ссавців. У техніці відома більш детальна інформація про доменні антитіла (див., наприклад, Патенти США № 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; WO 04/003019 і WO 03/002609). Нанотіла отримують з важких ланцюгів антитіл. Зазвичай нанотіло містить варіабельний домен і два константних домени (CH2 і CH3) і зберігає антиген-зв'язувальну здатність вихідного антитіла. Нанотіла можна отримати за допомогою способів, відомих в техніці (див., наприклад, Патенти США № 6,765,087, Патент США № 6,838,254, WO 06/079372). Унітіла складаються одного легкого ланцюга і одного важкого ланцюга антитіла IgG4. Унітіла

можна отримати шляхом видалення шарнірної області антитіл IgG4. Більш детальну інформацію про унітіла і способи їх отримання можна знайти в WO 2007/059782.

Крім зв'язувального фрагменту молекули відповідно до даного винаходу можуть містити фрагмент для підвищення часу напіввиведення молекули *in vivo*, наприклад, без обмежень поліетиленгліколь (ПЕГ), сироватковий альбумін людини, групи глікозилювання, жирні кислоти і декстран. Такі додаткові фрагменти можна кон'югувати або поєднувати іншим чином зі зв'язувальним фрагментом, із застосуванням способів, добре відомих в техніці.

Згідно з додатковим аспектом даного винаходу запропонована молекула нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність амінокислот CD134-зв'язувальної молекули згідно з першим аспектом даного винаходу. Послідовність амінокислот, кодована зазначеною молекулою нуклеїнової кислоти, може бути будь-якою частиною інтактного антитіла, такою як CDR, послідовністю, що містить один, два чи три CDR, або варіабельною областю важкого ланцюга або легкого ланцюга, або може бути повнорозмірним важким ланцюгом або легким ланцюгом. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначена молекула нуклеїнової кислоти кодує послідовність амінокислот, яка містить (1) ділянку CDR3, зокрема ділянку CDR3 важкого ланцюга, антитіла клону 12H3 та/або клону 20E5; (2) варіабельну область важкого ланцюга або варіабельну область легкого ланцюга антитіла клону 12H3 та/або клону 20E5; або (3) важкий ланцюг або легкий ланцюг антитіла клону 12H3 та/або клону 20E. Згідно з іншим варіантом реалізації зазначена молекула нуклеїнової кислоти кодує поліпептид, який містить послідовність амінокислот, обрану з групи, що складається з SEQ ID №:12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 або 19, або з групи, що складається з SEQ ID №:4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або 11.

Молекули нуклеїнових кислот, що запропоновані в даному винаході, можна отримати з будь-якого джерела, який виробляє антитіло до CD134 відповідно до даного винаходу. мРНК з клітин, що виробляють антитіло до CD134, можна виділити за допомогою стандартних технологій, клонувати та/або ампліфікувати із застосуванням ПЛР і технологій конструювання бібліотек, і провести скринінг згідно до стандартних протоколів для отримання молекул нуклеїнових кислот, що кодують послідовність амінокислот антитіла до CD134. Вказану мРНК можна застосовувати для отримання кДНК для застосування полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) або кДНК-клонування генів антитіл. Згідно з одним варіантом реалізації молекулу нуклеїнової кислоти отримують з гібридами, яка експресує антитіло до CD134, як описано вище, переважно гібридами, у якій одним з партнерів по злиттю є клітина трансгенної тварини - не людини, яка експресує гени імуноглобулінів людини. Згідно з іншим варіантом реалізації зазначена гібридома отримана з нетрансгенної тварини - не людини.

Молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує важкий ланцюг антитіла до CD134, можна сконструювати шляхом об'єднання молекули нуклеїнової кислоти, що кодує варіабельну область важкого ланцюга з молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує константну область важкого ланцюга. Аналогічним чином, молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує легкий ланцюг антитіла до CD134, можна сконструювати шляхом об'єднання молекули нуклеїнової кислоти, що кодує варіабельну область легкого ланцюга, з молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує константну область легкого ланцюга. Молекули нуклеїнових кислот, що кодують VH і VL ланцюги можна перетворити в гени повнорозмірного антитіла шляхом їх введення в вектори експресії, які вже кодують константні області важкого ланцюга і константні області легкого ланцюга, відповідно, так, щоб сегмент VH був функціонально зв'язаний з константною областю важкого ланцюга (CH) в межах вектора, а сегмент VL був функціонально зв'язаний з сегментом константної області легкого ланцюга (CL) в межах вектора. В якості альтернативи молекули нуклеїнових кислот, що кодують VH і VL ланцюги перетворюють в гени повнорозмірних антитіл шляхом з'єднання, тобто зшивання молекули нуклеїнової кислоти, яка кодує VH ланцюги, з молекулою нуклеїнової кислоти, що кодує VL і CL ланцюги. Того ж результату можна досягти, якщо застосовувати молекули нуклеїнових кислот, що кодують VL і CL ланцюги. Молекули нуклеїнових кислот, що кодують повнорозмірні важкі та/або легкі ланцюги, потім можна експресувати з клітки, в яку вони були введені, і можна виділяти антитіло до CD134.

Молекули нуклеїнових кислот можна застосовувати для рекомбінантної експресії великих кількостей антитіл до CD134, як описано нижче. Зазначені молекули нуклеїнових кислот також можна застосовувати для отримання інших зв'язуючих молекул, запропонованих в даному винаході, таких як химерні антитіла, одноланцюгові антитіла, імунoadгезини, діатіла, мутовані антитіла і похідні антитіл, що описані в інших розділах цієї заявки. Згідно з одним варіантом реалізації молекулу нуклеїнової кислоти застосовують в якості зонду або праймера для ПЛР для послідовностей специфічних антитіл. Наприклад, молекулу нуклеїнової кислоти - зонд можна застосовувати при реалізації способів діагностики, або молекулу нуклеїнової кислоти - праймер можна застосовувати для ампліфікації областей ДНК, які можна застосовувати, серед

іншого, для виділення послідовностей нуклеотидів для застосування при отриманні варіабельних областей антитіл до CD134.

Коли молекули ДНК, що кодують сегменти VH і VL антитіла до CD134 вже отримані, з вказаними молекулами ДНК можна проводити маніпуляції за допомогою технологій рекомбінантних ДНК, наприклад, перетворювати гени варіабельних областей в гени повнорозмірних ланцюгів антитіла, в гени фрагментів Fab або в ген scFv.

Згідно з додатковим аспектом даного винаходу вектор, який містить молекулу нуклеїнової кислоти, описано вище в даній заявці. Зазначена молекула нуклеїнової кислоти може кодувати частину легкого ланцюга або важкого ланцюга (таку як CDR або варіабельну область), повнорозмірний легкий або важкий ланцюг, поліпептид, який містить частину або повнорозмірний важкий або легкий ланцюг, або послідовність амінокислот похідного або антигензв'язуючого фрагменту антитіла.

Прикладом відповідного вектора експресії являється вектор, який кодує послідовність функціонально цілісної СН або CL імуноглобуліну, з відповідними сайтами рестрикції, сконструйованими так, щоб могла бути вставлена і експресуватися будь-яка послідовність VH або VL. Зазначений вектор експресії також може кодувати сигнальний пептид, який полегшує секрецію послідовності амінокислот ланцюга антитіла з клітиною-хазяїном. ДНК, що кодує вказану послідовність амінокислот ланцюга антитіла, можна клонувати у вектор так, щоб сигнальний пептид був пов'язаний з N-кінцем послідовності амінокислот ланцюга антитіла в одній рамці зчитування. Зазначений сигнальний пептид може бути сигнальним пептидом імуноглобуліну або гетерологічним сигнальним пептидом (тобто, сигнальним пептидом з білка - не-імуноглобуліну). Крім послідовності нуклеотидів, що кодує послідовність амінокислот антитіла до CD134 (гени ланцюгів антитіла) вектори експресії несуть в собі регуляторні послідовності, які контролюють експресію зазначених генів ланцюгів антитіла. Дизайн зазначеного вектора експресії, включаючи послідовності, призначені для селекції, і регуляторні послідовності, може залежати від таких факторів, як вибір клітини-хазяїна, яку потрібно трансформувати, рівень експресії бажаного білка і так далі. Регуляторні послідовності для експресії в клітинах-хазяїнах ссавців, включають вірусні елементи, які керують експресією білка високого рівня в клітинах ссавців, такі як промотори та/або енхансери, отримані з довгих кінцевих повторів ретровірусів, цитомегаловірусу (CMV) (такі як промотор/енхансер CMV), вірусу мавп 40 (SV40) (такі як промотор/енхансер SV40), аденовірусу (наприклад, основний пізній промотор аденовірусу (AdMLP)), вірусу поліоми, і сильні промотори ссавців, такі як природні промотори імуноглобулінів і актину.

Клітиною-хазяїном може бути клітина ссавців, комах, рослин, бактерій або дріжджів. Приклади відповідних ліній клітин-хазяїнів ссавців включають клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітини NSO, клітини PER-C6, клітини SP2, клітини HEK-293T, клітини NIH-3T3, клітини HeLa, клітини нирки новонародженого хом'ячка (BHK), клітини нирок африканської зеленої мавпи (COS), клітини печінково-клітинного раку людини (наприклад, Hep G2), клітини легенів людини, клітини A549 і цілий ряд інших ліній клітин. Приклади ліній клітин комах включають клітини Sf9 або Sf21. Приклади клітин рослин включають клітини тютюну звичайного, арабідопсису, мокриці, кукурудзи, пшениці, картоплі і т.д. Клітини-хазяїни бактерій включають *E. coli* і види *Streptomyces*. Приклади клітин-хазяїнів дріжджів включають *Saccharomyces cerevisiae* і *Pichia pastoris*.

Послідовності амінокислот зв'язувальної молекули, що експресуються різними лініями клітин або в організмі трансгенних тварин можуть володіти різним профілем глікозилювання. Однак зв'язувальні молекули, які кодуються молекулами нуклеїнових кислот, що запропоновані у даній заявці, або містять послідовності амінокислот, що запропоновані в даній заявці, являються частиною даного винаходу, незалежно від профілю глікозилювання зазначених зв'язувальних молекул.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропоновано спосіб отримання CD134-зв'язувальної молекули, згідно з визначенням, що приведено вище, за допомогою фагового відображення. Зазначений спосіб включає (а) синтезування бібліотеки антитіл людини на основі фага, (b) скринінг бібліотеки із застосуванням CD134 або його частини, (з) виділення фага, який зв'язується з CD134 або з його частиною, і (d) отримання антитіла з зазначеного фага. Один приклад способу отримання бібліотеки антитіл включає етап (а) імунізації тварини, відмінного від людини, що містить локуси імуноглобуліну людини з CD134 або з їх антигенними частинами для провокування імунної відповіді; (b) вилучення антитіл що виробляють клітини з імунізованих тварини; (c) виділення РНК, що кодує важкий і легкий ланцюги антитіл до CD134 з витягнутих клітин; (d) зворотного транскрибування зазначеної РНК з отриманням кДНК; (e) ампліфікації кДНК; і (f) вставки кДНК в вектор фагового відображення так, що зазначені антитіла

експресувалися на фагі. Рекombінантні антитіла до CD134 людини або їх антиген-зв'язувальні фрагменти можна виділити за допомогою скринінгу в бібліотеці рекombінантних комбінаторних антитіл. Зазначена бібліотека може бути бібліотекою фагового відображення scFv, що згенерована із застосуванням кДНК VL і VH людини, отриманих з мРНК, виділеної з В-лімфоцитів. Способи отримання і скринінгу таких бібліотек відомі в техніці. Набори для генерування бібліотек відображення фага є у продажу.

Відповідно до одного з переважного варіанту реалізації даного винаходу запропонована композиція, наприклад, фармацевтична композиція, що містить одну або поєднання зв'язувальних молекул, що описувані в даній заявці, і необов'язково фармацевтично прийнятну основу. Зазначені композиції можна отримати стандартними способами, відомими в техніці. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначені композиції містять антитіло до CD134 або його антиген-зв'язувальний фрагмент. Відповідно до одного конкретного варіанту реалізації зазначена композиція містить антитіло клону 12H3 та/або клону 20E5, або антиген-зв'язувальний фрагмент якого-небудь з даних антитіл. Згідно з іншими варіантами реалізації зазначена композиція містить похідну антитіла клону 12H3 та/або клону 20E5. Термін "фармацевтично прийнятна основа" відноситься до будь-якої неактивної речовини, яка придатна для застосування у складі лікарської форми для доставки зв'язувальної молекули. Основою може бути антиадгезив, сполучна речовина, матеріал покриття, розпушувач, наповнювач або розчинник, консервант (такий як антиоксидант, антибактеріальний або протигрибковий агент), підсолоджувач, агент, що уповільнює всмоктування, змочувальну речовину, емульгатор, буфер і т.п.

Непептидні молекули відповідно до даного винаходу можна вводити перорально, в тому числі, у складі суспензій, таблеток і подібних лікарських форм. Рідкі лікарські форми можна вводити шляхом інгаляцій ліофілізованих або розпорошених мікрокапсул. Також можна застосовувати супозиторії. Можна застосовувати додаткові фармацевтичні основи для контролювання тривалості дії молекул відповідно до даного винаходу. Дозування та режим введення для лікарської форми, яка була обрана, можна визначити за допомогою стандартних процедур, добре відомих в техніці. Такі процедури включають екстраполяцію оціночного режиму дозування з моделей, заснованих на тваринах, і наступне визначення оптимального дозування у людини в клінічних дослідженнях з підбору оптимальних доз.

Зазначені композиції можуть бути в будь-якій зручній формі, такий як рідкі, напіврідкі і тверді лікарські форми. Різні лікарські форми зазначених композицій можна отримувати за допомогою стандартних технологій, відомих в техніці.

Відносна кількість зв'язувальної молекули, що включається в композицію, може варіювати залежно від цілого ряду факторів, таких як бажані характеристики вивільнення, фармакодинаміки, специфічна зв'язувальна молекула і основи що застосовуються, і лікарська форма. Кількість зв'язувальної молекули в лікарській формі для одноразового введення, як правило, має бути такою, що викликає терапевтичний ефект, але може бути і меншою кількістю. Як правило, вказану кількість можна варіювати від приблизно 0,001 відсотка до приблизно 99 відсотків, від приблизно 0,1 відсотка до приблизно 70 відсотків, або від приблизно 1 відсотка до приблизно 30 відсотків від загальної маси лікарської форми.

Крім зазначеної зв'язувальної молекули в композицію або в якості окремої частини в режим лікування можна включити одного або більше додаткових терапевтичних агентів. Приклади додаткових терапевтичних агентів розкриваються в даній заявці нижче. Фахівець у даній галузі техніки може без зусиль підібрати підходящу кількість додаткового терапевтичного агента, якого потрібно включити у вказану композицію, і ним можна варіювати залежно від цілого ряду факторів, таких як застосування конкретного агента та основи, лікарська форма та бажані характеристики вивільнення та фармакодинаміки. Кількість додаткового терапевтичного агента, що включене в лікарську форму для одноразового введення, як правило, має бути таким, яке викликає терапевтичний ефект, але може бути також і меншою кількістю.

Зв'язувальні молекули і фармацевтичні композиції, що містять зв'язувальну молекулу, запропоновані в даній заявці, застосовні для терапевтичних, діагностичних та інших цілей, таких як посилення імунної відповіді, лікування раку, підвищення ефективності інших протипухлинних засобів або підвищення ефективності вакцин, і володіють цілим рядом корисних властивостей, таких як застосування в якості медикаментів або діагностичних агентів. Так, згідно кращого аспекту даного винаходу запропоновані способи застосування зазначених зв'язувальних молекул або фармацевтичних композицій.

Згідно з додатковим аспектом даного винаходу запропоновано спосіб модулювання опосередкованого CD134 людини протипухлинної імунної відповіді, включаючи посилення ефекторної функції Т-клітин людини, що експресують CD134 людини, та/або ослаблення

супресорної функції Трег людини, що експресують CD134 людини, із застосуванням зв'язувальних молекул, які зв'язуються з CD134 людини, включаючи антитіла до CD134 людини, які (1) уникають взаємодії природного OX40L людини з рецептором CD134 людини та/або (2) не блокують сигнального шляху, опосередкованого CD134 людини, після заняття їх природним OX40L людини.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропоновано спосіб модулювання опосередкованого CD134 людини протипухлинної імунної відповіді, причому зазначений спосіб не включає зв'язувальні молекули, які зв'язуються з CD134 людини, включаючи антитіла до CD134 людини, такі як імітатори, які взаємодіють зі сполучним доменом OX40L людини на рецептори CD134 людини та/або блокують сигнальні шляхи в CD134-клітинах людини з OX40L.

У цьому винаході розкриваються зв'язувальні молекули, які зв'язуються з CD134 людини, включаючи антитіла до CD134 людини в цілях протипухлинної терапії. Антитіла до CD134 людини зв'язуються з позаклітинним доменом CD134 людини. Більш конкретно, антитіла до CD134 людини зв'язуються з областями, що не пов'язують OX40L (тобто, зазначені антитіла до CD134 людини не повністю блокують зв'язування OX40L з CD134 людини) на позаклітинному домені CD134 людини на активованих Еефа і Трег людини.

Згідно одному конкретному аспекту запропоновано способи посилення імунної відповіді у ссавців, що включають введення вказаному ссавцю терапевтично ефективної кількості зв'язувальної молекули, описаної в даній заявці. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначеною зв'язувальною молекулою є антитіло до CD134 або його антиген-зв'язувальний фрагмент, а вказаний ссавець являється людиною. Згідно з додатковим варіантом реалізації зазначена зв'язувальна молекула являється антитілом клону 12H3 та/або клону 20E5, або антиген-зв'язувальним фрагментом будь-якого з зазначених антитіл. Термін "посилення імунної відповіді" означає стимулювання, провокування, збільшення, посилення або підвищення будь-якої відповіді імунної системи ссавця. Імунна відповідь може бути клітинною відповіддю (тобто, клітинно-опосередкованою, наприклад, опосередкованою цитотоксичними Т-лімфоцитами) або гуморальною відповіддю (тобто, відповіддю, опосередкованою антитілами) і може бути первинною або вторинною відповіддю. Приклади посилення імунної відповіді включають підвищення активності CD4+-Т-хелперів і генерування цитотоксичних Т-лімфоцитів. Посилення імунної відповіді можна оцінювати за цілою низкою показників *in vitro* або *in vivo*, що відомі фахівцям у даній галузі техніки, включаючи, але без обмежень, проби на цитотоксичні Т-лімфоцити, виділення цитокінів (наприклад, вироблення IL-2), регресія пухлин, виживання тварин з пухлинами, вироблення антитіл, проліферація імунних клітин, експресія поверхневих маркерів клітин і цитотоксичність. Згідно з одним варіантом реалізації зазначений спосіб призводить до посилення клітинної імунної відповіді, зокрема відповіді цитотоксичних Т-лімфоцитів.

Відповідно до одного аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому при насичуючій концентрації зазначеної зв'язувальної молекули або вище, дія на зв'язування OX40L з CD134 знижується не більше ніж на 70 %, на клітинах, що експресують CD134 людини, що вимірюють за допомогою заснованого на флуоресценції проточно-цитометричного аналізу, описаного в Прикладі 2(f). Більш переважно, дія на зв'язування OX40L з CD134 знижується, але не більше ніж приблизно на 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше, або, переважно зменшення зв'язування взагалі не відбувається.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, причому при концентрації 70 нмоль зазначеної зв'язувальної молекули дія на зв'язування OX40L з CD134 знижується не більше ніж на 70 %, на клітинах, що експресують CD134 людини, що вимірюють за допомогою заснованого на флуоресценції проточно-цитометричного аналізу, описаного в Прикладі 2(f). Більш переважно, дія на зв'язування OX40L з CD134 знижується, але не більше ніж приблизно на 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше, або, переважно зменшення зв'язування взагалі не відбувається.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка конкурує за зв'язування з CD134 людини з антитілом, що містить (1) варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот SEQ ID №:12 і (2) варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот SEQ ID №:13, на що вказує перехресне конкурування між неміченою зазначеною зв'язувальною молекулою і вказаним антитілом з флуоресцентною міткою на РНА-стимульованих експресуючих CD134 людини Т-лімфоцитах, що вимірюють за допомогою проточної цитометрії (більш докладно описаної в Прикладі 2(e)). Переважно, зв'язування зазначеного антитіла при насичуючій концентрації або вище

знижується щонайменше приблизно на 50 %, або приблизно на 60 %, або приблизно на 70 %, або приблизно на 80 %, або приблизно на 90 % або більше, і переважно скасовується, коли проводять аналіз перехресного конкурування з вказаною зв'язувальною молекулою.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка конкурує за зв'язування з CD134 людини з антитілом, що містить (1) варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот SEQ ID №:4 і (2) варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот SEQ ID №:5, на що вказує перехресне конкурування між неміченою зазначеною зв'язувальною молекулою і вказаним антитілом з флуоресцентною міткою на РНА-стимульованих експресованих CD134 людини Т-лімфоцитах, що вимірюють за допомогою проточної цитометрії (більш докладно описаної в Прикладі 2(е)). Переважно, зв'язування зазначеного антитіла при насичуючій концентрації або вище знижується щонайменше приблизно на 50 %, або приблизно на 60 %, або приблизно на 70 %, або приблизно на 80 %, або приблизно на 90 % або більше, і переважно скасовується, коли проводять аналіз перехресного конкурування з вказаною зв'язувальною молекулою.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому дія на зв'язування OX40L з CD134 на клітинах, що експресують CD134 людини, зменшується не більше ніж приблизно на 70 %, або приблизно на 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше, причому зазначена зв'язувальна молекула також не перешкоджає імуностимулюючій та/або проліферативній відповіді OX40L в ефекторних Т-клітинах, що експресують CD134 людини.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD134 людини, зазначена причому зв'язувальна молекула не перешкоджає зв'язуванню рецептору CD134 людини (OX40) з лігандом OX40L, і причому зазначена зв'язувальна молекула також не перешкоджає імуностимулюючій та/або проліферативній відповіді OX40L в ефекторних Т-клітинах, що експресують CD134 людини.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому дія на зв'язування OX40L з CD134 на Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини, зменшується не більше ніж приблизно на 70 %, або приблизно на 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше, і причому зазначена зв'язувальна молекула підсилює імуностимулюючу та/або проліферативну відповідь OX40L в ефекторних Т-клітинах, що експресують CD134 людини.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула яка зв'язується з CD134 людини, причому зазначена зв'язувальна молекула не перешкоджає зв'язуванню рецептору CD134 людини (OX40) з лігандом OX40L, і причому зазначена зв'язувальна молекула підсилює імуностимулюючу та/або проліферативну відповідь OX40L в ефекторних Т-клітинах, що експресують CD134 людини.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому дія на зв'язування OX40L з CD134 на Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини, зменшується не більше ніж приблизно на 70 %, або приблизно на 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше, і причому зазначена зв'язувальна молекула також не перешкоджає реакціям, пов'язаним з супресорною функцією, регуляторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому зазначена зв'язувальна молекула не перешкоджає зв'язуванню рецептору CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 (OX40L), і причому зазначена зв'язувальна молекула також не перешкоджає реакціям, пов'язаним з супресорною функцією, регуляторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому дія на зв'язування OX40L з CD134 на Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини, зменшується не більше ніж приблизно на 70 %, або приблизно на 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше, і причому зазначена зв'язувальна молекула підсилює реакції, пов'язані з супресорною функцією, регуляторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому зазначена зв'язувальна молекула не перешкоджає зв'язуванню рецептору CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 (OX40L), і причому зазначена зв'язувальна молекула підсилює реакції, пов'язані з супресорною функцією, регуляторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому дія на зв'язування OX40L з CD134 на Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини, зменшується не більше ніж приблизно на 70 %, або приблизно на 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше, і причому зазначена зв'язувальна молекула також не перешкоджає проліферативним реакціям, регуляторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому зазначена зв'язувальна молекула не пригнічує і не перешкоджає зв'язуванню рецептора CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 (OX40L), і причому зазначена зв'язувальна молекула також не перешкоджає проліферативним реакціям регуляторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула яка зв'язується з CD134 людини, причому дія на зв'язування OX40L з CD134 на Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини, зменшується не більше ніж приблизно на 70 %, або приблизно на 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше, і причому зазначена зв'язувальна молекула пригнічує проліферативні реакції регуляторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.

Відповідно до іншого аспекту даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD134 людини, причому зазначена зв'язувальна молекула не пригнічує і не перешкоджає зв'язуванню рецептору CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 (OX40L), і причому зазначена зв'язувальна молекула пригнічує проліферативні реакції регуляторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.

Нижче описаний відповідний спосіб вимірювання одночасного зв'язування OX40L і антитіла до CD134 людини. Флуоресцентний сигнал FITC (середнє геометричне або середня інтенсивність флуоресценції (MFI)) зв'язування OX40L на PHA-стимульованих PBMC (мононуклеарних клітин периферичної крові), що експресують CD134, у відсутності антитіла до CD134 людини, приймають за 100 %. Флуоресцентний сигнал PE (MFI) антитіла до CD134 людини, що зв'язується з PHA-стимульованими PBMC, експресуючими CD134, у відсутності OX40L людини приймають за 100 %. Зменшення зазначеного флуоресцентного сигналу FITC і флуоресцентного сигналу PE, коли і OX40L людини, і антитіло до CD134 людини додають одночасно до PHA-стимульованим PBMC, експресуючих CD134 людини, переважно не повинно перевищувати приблизно 70 %, або приблизно на 60 %, або приблизно 50 %, або приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше.

Нижче описаний відповідний спосіб вимірювання відсутності перешкоджання OX40L-опосередковані проліферативні реакції Тефф. Включення міченого тритієм тимідину або BrdU в Тефф, експресуючі CD134 людини, після обробки OX40L людини приймають за 100 %. Зміна (тобто, спад або наростання) такого включення міченого тритієм тимідину або BrdU, коли і OX40L людини, і антитіло до CD134 людини одночасно додають до активованих (наприклад, PHA-стимульованим або стимульованим гранулами з антитілами до CD3/CD28) Тефф, експресуючих CD134 людини, переважно не повинно перевищувати приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше.

Нижче описаний відповідний спосіб вимірювання посилення OX40L-опосередкованих проліферативних реакцій Тефф. Включення міченого тритієм тимідину або BrdU в Тефф, що експресують CD134 людини, після обробки OX40L людини приймають за 100 %. Посилення такого включення міченого тритієм тимідину або BrdU, коли і OX40L людини, і антитіло до CD134 людини одночасно додають до активованих (наприклад, PHA-стимульованим або стимульованим гранулами анти-CD3/CD28) Тефф, експресуючих CD134 людини, переважно перевищує приблизно 30 %, або приблизно 40 %, або приблизно 50 %, або приблизно 60 %, або приблизно 70 % або більше.

Нижче описаний відповідний спосіб вимірювання відсутності перешкоджання OX40L-опосередкованою супресорною функцією Трег. Включення міченого тритієм тимідину або BrdU в Еефф, що експресують CD134 людини, які культивують спільно з Еефф, експресуючими CD134 людини (наприклад, співвідношення Тефф/Трег = 1:1), після обробки OX40L людини приймають за 100 %. Зміна (тобто, спад або наростання) такого включення міченого тритієм тимідину або BrdU, коли і OX40L людини, і антитіло до CD134 людини одночасно додають до активованих (наприклад, PHA-стимульованим або стимульованим гранулами анти-CD3/CD28) Тефф, експресуючих CD134 людини, які культивують спільно з Тефф, експресуючими CD134 людини (наприклад, співвідношення Тефф/Трег = 1:1) переважно не повинно перевищувати приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше.

Нижче описаний відповідний спосіб вимірювання посилення OX40L-опосередкованою супресорною функцією Трег. Включення міченого тритієм тимідину або BrdU в Еефф, експресуючими CD134 людини, які культивують спільно з Еефф, експресуючими CD134 людини (наприклад, співвідношення Тефф/Трег = 1:1), після обробки OX40L людини приймають за 100 %. Посилення такого включення міченого тритієм тимідину або BrdU, коли і OX40L людини, і антитіло до CD134 людини одночасно додають до активованих (наприклад, РНА-стимульованим або стимульованим гранулами з анти-CD3/CD28) Тефф, експресуючих CD134 людини, які культивують спільно з Тефф, експресуючими CD134 людини (наприклад, співвідношення Тефф/Трег = 1:1) переважно перевищує приблизно 30 %, або приблизно 40 %, або приблизно 50 %, або приблизно 60 %, або приблизно 70 % або більше.

Нижче описаний відповідний спосіб вимірювання відсутності перешкоджання OX40L-опосередкованою проліферативним реакціям Трег. Включення міченого тритієм тимідину або BrdU в Трег, експресуючими CD134 людини, після обробки OX40L людини приймають за 100 %. Зміна (тобто, спад або наростання) такого включення міченого тритієм тимідину або BrdU, коли і OX40L людини, і антитіло до CD134 людини одночасно додають до активованих (наприклад, РНА-стимульованим або стимульованим гранулами анти-CD3/CD28) Трег, експресуючих CD134 людини, переважно не перевищує приблизно 30 %, або приблизно 20 %, або приблизно 10 % або менше.

Нижче описаний відповідний спосіб вимірювання придушення OX40L- опосередкованих проліферативних реакцій Трег. Включення міченого тритієм тимідину або BrdU в Трег, експресуючими CD134 людини, після обробки OX40L людини приймають за 100 %. Зменшення такого включення міченого тритієм тимідину або BrdU, коли і OX40L людини, і антитіло до CD134 людини одночасно додають до активованих (наприклад, РНА-стимульованим або стимульованим гранулами анти-CD3/CD28) Трег, експресуючих CD134 людини, переважно перевищує приблизно 30 %, або приблизно 40 %, або приблизно 50 %, або приблизно 60 %, або приблизно 70 % або більше.

Згідно ще одному аспекту даного винаходу запропоновано спосіб лікування раку у ссавців, що включає введення вказаному ссавцю терапевтично ефективної кількості зв'язувальної молекули, що описана в даній заявці.

Згідно ще одному кращому варіанту реалізації даного винаходу зазначена зв'язувальна молекула являється антитілом клону 12H3 та/або клону 20E5, або антиген-зв'язувальним фрагментом одного будь-якого із зазначених антитіл. Згідно з додатковим варіантом реалізації вказаний ссавець являється людиною.

Відповідно до іншого кращого варіанту реалізації даного винаходу запропоновано спосіб профілактики раку у ссавців, що включає введення вказаному ссавцю терапевтично ефективної кількості зв'язувальної молекули, що описана в даній заявці.

Термін "попередження раку" або "профілактика раку" відноситься до уповільнення, придушення або попередження початку раку у ссавця, у якого початок онкогенезу або розвитку пухлини не має явно вираженого характеру, але визначається схильність до раку або, наприклад, за допомогою генетичного скринінгу, або іншим шляхом. Також даний термін включає лікування ссавця, який страждає передраковим захворюванням з метою припинення прогресування передракового захворювання з його переходом в рак, або сприяння його регресії. Приклади передракового захворювання включають гіперплазію, дисплазію і метаплазію. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначена зв'язувальна молекула являється антитілом до CD134 або його фрагментом, що описано в даній заявці. Згідно з додатковим варіантом реалізації даного винаходу запропонована зв'язувальна молекула, яку вибирають з антитіла клону 12H3 та/або клону 20E5, або антиген-зв'язувального фрагмента будь-якого із зазначених антитіл. Згідно з додатковим варіантом реалізації вказаний ссавець являється людиною.

За допомогою способу згідно з винаходом можна лікувати різні типи пухлин, включаючи злоякісні чи доброякісні та/або первинні або вторинні. Приклади таких типів раку відомі фахівцям в даній області техніки і перераховані в стандартних довідниках, таких як Merck Manual of Diagnosis And Therapy (опублікований компанією "Merck").

Згідно з іншим варіантом реалізації даного винаходу зазначені зв'язувальні молекули можна вводити самостійно в якості монотерапії, або вводити у поєднанні з одним або більше додатковими терапевтичними агентами або засобами. Так, згідно ще одному варіанту реалізації запропоновано спосіб лікування або профілактики раку за допомогою комбінованої терапії, причому вказаний спосіб включає введення зв'язувальної молекули, що розкривається в даній заявці, в поєднанні з одним або більше додатковими засобами або терапевтичними агентами. Термін "додатковий засіб" відноситься до засобу, який не включає зв'язувальну молекулу,

запропоновану в розкритті, як терапевтичного агента. Термін "додатковий терапевтичний агент" відноситься до будь-якого терапевтичного агента, відмінного від зв'язувальної молекули, запропонованій в даній заявці. Згідно з деякими варіантами реалізації зазначена зв'язувальна молекула являється антитілом до CD134 людини клону 12H3 та/або клону 20E5, або антиген-зв'язувальним фрагментом будь-якого із зазначених антитіл. Згідно одному конкретному аспекту даного розкриття запропоновано комбінована терапія для лікування раку у ссавця, яка включає введення вказаному ссавцю терапевтично ефективної кількості зв'язувальної молекули, запропонованої в даній заявці, в поєднанні з одним або більше терапевтичними агентами. Згідно з додатковим варіантом реалізації вказаний ссавець являється людиною.

У поєднанні зі зв'язувальною молекулою можна застосовувати найрізноманітніші протипухлинні агенти. Фахівець у даній галузі техніки здатний уявити наявність і розробку інших протипухлинних засобів, які можна застосовувати в поєднанні зі способами і зв'язувальними молекулами згідно з даним винаходом і не повинен обмежуватися тими формами терапії, які вказані в даній заявці. Приклади категорій додаткових терапевтичних агентів, які можна застосовувати в комплексній терапії при лікуванні раку, включають: (1) хіміотерапевтичні агенти, (2) імунотерапевтичні агенти і (3) агенти гормональної терапії.

Термін "хіміотерапевтичний агент" відноситься до хімічної або біологічної речовини, яка може викликати загибель ракових клітин, або перешкоджати поділу, відновленню, зростанню та/або функції ракових клітин. Приклади хіміотерапевтичних агентів включають агенти, що розкриваються в WO 2006/088639, WO 2006/129163 і US 2,006,015,3808, розкриття яких включено в дану заявку за допомогою посилання.

Термін "імунотерапевтичний агент" відноситься до хімічної або біологічної речовини, який посилює імунну відповідь ссавця. Приклади імунотерапевтичних агентів включають: бацили Кальметта-Герена (BCG); цитокіни, такі як інтерферони; вакцини, такі як персоналізована імунотерапія MyVax, OnyVax-P, онкофаг, GRNVACI, FavId, Провеген, GVAX, Ловаксин С, BiovaxID, GMXX і NeuVax; і такі антитіла як алемтузумаб (КАМПАТ), бевацизумаб (АВАСТИН), цетуксимаб (ЕРБИТУКС), гемтузумаб озогаміцин (МІЛОТАРГ), ібрітумомаб тіуксетан (ЗЕВАЛІН), панітумумаб (БЕКІБІКС), рітуксимаб (РІТУКСАН, МАБТЕРА), транстузумаб (ГЕРЦЕПТИН), тозітумомаб (БЕККАР), тремелімумаб, CAT-3888 і антагоністичні антитіла до рецепторів CD40, які розкриваються в WO 2003/040170.

Термін "агент для гормональної терапії" відноситься до хімічної або біологічної речовини, яка інгібує або виключає вироблення гормону, або інгібує або нейтралізує дію гормону на ріст та/або виживання ракових клітин. Приклади таких агентів, відповідних для реалізації способів згідно з цією заявкою, включають агенти, які розкриваються в US 20070117809. Приклади конкретних агентів для гормональної терапії включають тамоксифен (НОЛВАДЕКС), тореміфен (ФАРЕСТОН), фулвестран (ФАСЛОДЕКС), анастрозол (АРИМІДЕКС), екземестран (АРОМАЗІН), летрозол (ФЕМАРА), мегестрола ацетат (МЕГЕЙК), госелерін (ЗОЛАДЕКС) і лейпролід (ЛЮПРОН). Зв'язувальні молекули згідно з цим розкриттям можна також застосовувати в поєднанні з нелікарським гормональними засобами, такими як (1) хірургічні способи, які спрямовані на видалення частини органів або залоз, які беруть участь у виробленні гормону, таких як яєчники, яєчка, надниркові залози і гіпофіз, і (2) променева терапія, при якій органи або залози пацієнта піддають опроміненню в кількості, достатній для інгібування або усунення вироблення цільового гормону.

Згідно з іншим варіантом реалізації даного винаходу запропоновано спосіб лікування або профілактики раку за допомогою комбінованої терапії, причому вказаний спосіб включає введення зв'язувальної молекули, що розкривається в даній заявці, і операцію з видалення пухлини. Вказану зв'язувальну молекулу можна вводити ссавцю перед, під час або після зазначеної операції.

Комбінована терапія, що спрямована на лікування раку, також включає поєднання зв'язувальної молекули, запропонованої в даній заявці, з променевою терапією, такою як іонізуюча (електромагнітна) променева терапія (наприклад, рентгенівське або гамма-випромінювання) і променева терапія пучком частинок (наприклад, випромінювання з високою лінійною передачею енергії). Джерело випромінювання може бути зовнішнім або внутрішнім по відношенню до організму ссавця. Вказану зв'язувальну молекулу можна вводити ссавцю перед, під час або після зазначеної променевої терапії.

Зв'язувальні молекули і композиції, запропоновані в даній заявці, можна вводити будь-яким підходящим ентеральним або парентеральним шляхом введення. Термін "ентеральний шлях" введення має на увазі введення через будь-яку частину шлунково-кишкового тракту. Приклади ентерального шляху введення включають оральне введення через слизові оболонки, букальний і ректальний шлях, або внутрішньошлунковий шлях. Термін "парентеральний шлях" шлях

введення що відноситься до шляху введення, відмінному від ентерального. Відповідний шлях і спосіб введення може варіювати залежно від цілого ряду факторів, таких як специфічне антитіло, яке застосовують, бажана швидкість всмоктування, специфічна лікарська форма або форма дозування, яку застосовують, тип або тяжкість розладу, який лікують, специфічну ділянку дії і стан пацієнта, і фахівець в даній області техніки може легко підібрати такий спосіб.

Термін "терапевтично ефективна кількість" зв'язувальної молекули відноситься до кількості, яка є ефективною для призначеної терапевтичної мети. Наприклад, в контексті посилення імунної відповіді "терапевтично ефективною кількістю" є будь-яка кількість, яка ефективно стимулює, провокує, збільшує, підвищує або сприяє будь-якій відповіді імунної системи ссавця. У контексті лікування раку "терапевтично ефективною кількістю" є будь-яка кількість, якої досить, щоб викликати будь-яку бажану чи корисну дію у ссавця, яку лікують, наприклад, придушення подальшого зростання або розповсюдження ракових клітин, загибель ракових клітин, придушення рецидиву раку, зменшення болю, пов'язаного з раком, або підвищення виживання ссавця. Згідно способу профілактики раку "терапевтично ефективною кількістю" являється будь-яка кількість, яка є ефективною для уповільнення, придушення або попередження початку раку у ссавця, якому вводять вказану зв'язувальну молекулу.

Терапевтично ефективна кількість зв'язувальної молекули звичайно варіює в діапазоні від приблизно 0,001 до приблизно 500 мг/кг і більше, зазвичай від приблизно 0,05 до приблизно 100 мг/кг маси тіла зазначеного ссавця. Наприклад, вказана кількість може становити приблизно 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг, 50 мг/кг або 100 мг/кг від маси тіла зазначеного ссавця. Згідно з деякими варіантами реалізації терапевтично ефективна кількість антитіла до CD134 людини варіює в діапазоні від 0,1 до 30 мг/кг від маси тіла ссавця. Фахівець у даній галузі техніки може легко підібрати точний рівень доз, який потрібно вводити, і такий рівень буде залежати від цілого ряду факторів, таких як тип або тяжкість розладу, який лікують, від конкретної застосовуваної зв'язувальної молекули, шляху введення, часу введення, тривалості лікування, конкретних застосовуваних додаткових засобів, віку, статі, патологічного стану, загального стану здоров'я і анамнезу пацієнта, якого потрібно лікувати, і подібних факторів, добре відомих в техніці.

Зв'язувальну молекулу або композицію зазвичай вводять в декілька етапів. Інтервали між одноразовими дозами можуть складати, наприклад, раз на тиждень, раз на місяць, кожні три місяці або раз на рік. Приклади режимів лікування включають введення раз на тиждень, раз на два тижні, раз на три тижні, раз на чотири тижні, раз на місяць, раз в 3 місяці або раз на 3 або 6 місяців. Звичайні режими дозування для антитіла до CD134 людини включають 1 мг/кг від маси тіла або 3 мг/кг від маси тіла внутрішньовенно, із застосуванням одного з наступних графіків дозування: (i) шість доз раз на чотири тижні, потім раз на три місяці; (ii) раз на три тижні; (iii) 3 мг/кг від маси тіла один раз, потім 1 мг/кг від маси тіла раз на три тижні.

Даний винахід додатково проілюстровано такими прикладами, які не призначені, щоб будь-яким чином обмежити область даного винаходу. Навпаки, має бути ясно, що є місце для різних інших варіантів реалізації, модифікацій і еквівалентів, які після прочитання опису в даній заявці, можуть уявити собі фахівці в даній галузі техніки, не відхиляючись від духу даного винаходу та/або області формули винаходу.

#### Приклади

Приклад 1. Генерування моноклональних антитіл миші до CD134 людини (=OX40)

(а). Генерування клітин коммах Sf9, що експресують CD134 на своїй поверхні

кДНК, що кодує білок CD134 людини (GenBank, ідентифікаційний номер CAB96543.1; див. SEQ ID № 1) оптимізували для експресії в клітинах коммах Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) і синтезували за допомогою GENEART, Регенсбург, Німеччина (див. SEQ ID № 2). Вказану кДНК субклонували в плазмиду переносу на основі бакуловірусів pVL1393 (набір для трансфекції, кат. Номер 560129; "BD Biosciences"). Потім клітини коммах Sf9 (ATCC) піддавали спільній трансфекції з плазмідною переносу pVL1393, що містить кДНК, що кодує CD134 людини, разом з ДНК бакуловірусів BaculoGold (набір для трансфекції BD), а потім інкубували при температурі 27° С протягом 4-5 днів. Після зазначеного етапу спільної трансфекції надосадову рідину відбирали і зберігали при температурі 4° С, і застосовували її для інфікування наступних клітин коммах Sf9 для ампліфікації вірусу. Для даної мети клітки коммах Sf9 трансфікували ампліфікованим рекомбінантним бакуловірусом, а потім інкубували при температурі 27° С протягом 3-5 днів. Зазначені клітки коммах Sf9 відбирали, промивали стерильним ФСБ (фосфатно-сольовим буфером), відбирали аліквоти  $5 \times 10^6$  кліток/250 мкл в ФСБ і зберігали при температурі -80° С з метою отримання лізатів клітин. Перед зберіганням експресію CD134 людини на поверхні кліток коммах Sf9 підтверджували із застосуванням кон'югованого з

фікоеритрину (PE) антитіла миші (1:10) до CD134 людини (клон АСТ35; "BDBiosciences") і проточної цитометрії.

(b). Імунізація та генерування моноклональних антитіл миші до CD134 людини

Мишам BALB/c (самки, вік 6 тижнів; "Charles River Laboratories") підшкірно вводили  $\approx 400$  мкл лізату клітин комах Sf9, трансфікованих CD134 людини (аліквоту лізату клітин 250 мкл + 250 мкл повного ад'юванту Фрейнда; "Sigma") в День 0. Аналогічні підшкірні ін'єкції з введенням лізатів клітин комах Sf9, трансфікованих CD134 людини, і неповного ад'юванту Фрейнда ("Sigma") проводили в День 21 і День 42. У День 61 і День 62 проводили внутрішньочеревне введення бустер-دوزи лізатів клітин комах Sf9, трансфікованих CD134 людини, (250 мкл/миша) без ад'юванту. У День 65 спленоцити, що отримані від імунізованих мишей, об'єднували з клітинами мієломи SP 2/0 (ATCC) із застосуванням стандартної технології гібридоми, спочатку описаної Köhler and Milstein (Nature 1975; 256: p 495-497). Гібридоми, які виробляли антитіла (клас IgG миші) до CD134 людини (проводили скринінг за допомогою стандартного ELISA і проточної цитометрії із застосуванням гібридного білка рекомбінантної CD134 людини: Fc $\gamma$ 1 людини ("R&D Systems"), і бластні CD4 Т-лімфоцити, стимульовані РНА ("Roche") і експресуючі CD134 людини (див. Приклад 2 нижче) в якості мішеней, відповідно, вирощували, кріоконсервували і клонували шляхом граничного розведення. Специфічні моноклональні антитіла до CD134 людини очищали за допомогою колонок з білком G ("GE Healthcare"), і отримували в організмі миші моноклональні антитіла до CD134 людини-клон 12H3 (антитіло миші-ізотип IgG1к; визначали за допомогою набору визначення ізотипу моноклональних антитіл миші IsoStrip™ компанії "Roche") і клон 20E5 (антитіло миші-ізотип IgG1к; те ж саме).

Приклад 2. Опис властивостей моноклональних антитіл миші до CD134 людини-клонів 12H3 і 20E5 за допомогою проточної цитометрії

(а) Експресія CD134 на Т-лімфоцитах людини, стимульованих РНА

Мононуклеарні клітини периферичної крові людини (PBMC), що отримані від здорових донорів (за інформованою згодою), виділяли за допомогою центрифугування в градієнті щільності на Lymphoprep (1.077 г/мл; "Nycomed"). Потім до  $1-2 \times 10^6$  PBMC/мл у живильному середовищі RPMI-1640 ("Gibco") що містить 10 % фетальної сироватки телят ("Bodinco") і 50 мкг/мл гентаміцину ("Gibco") додавали 0, 0,1, 1,0 або 10,0 мкг/мл фітогеммаглютиніну-М (PHA-M; "Roche") і інкубували при температурі 37° C/5 % CO<sub>2</sub> протягом 1-3 днів. Після культивування PBMC відбирали і поміщали при щільності  $1-2 \times 10^6$  клітин/мл в охолоджений льодом фосфатно-сольовий буфер, що містить 0,1 % бичачого сироваткового альбуміну ("Sigma")/0,05 % NaN<sub>3</sub> (PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>) з додаванням 10 % змішаної сироватки людей (HPS; блокування рецепторів Fc $\gamma$ ; "BioWhittaker"). Клітини інкубували з 10 мкг/мл комерційного антитіла миші до CD134 людини-клон АСТ35 (антитіло миші, ізотип IgG1; "BD Biosciences", Альпен-аан-ден-Рійн, Голландія) протягом 30 хвилин при температурі 4° C. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини додатково інкубували з розведеними 1:200 PE-кон'югованими антитілами кози до IgG миші ("Jackson ImmunoResearch") протягом 30 хвилин при температурі 4° C. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини інкубували з розведеними 1:20 антитілами миші до CD3 людини, кон'югованими з флуоресцеїну ізотіоціанатом (FITC) ("BD Biosciences") з метою виявлення Т-лімфоцитів протягом 30 хвилин при температурі 4° C. Після активного промивання в ФСБ/БСА NaN<sub>3</sub> клітини фіксували в 2 % формальдегіді в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> протягом 30 хвилин при температурі 4° C. Зв'язування антитіл вимірювали за допомогою проточної цитометрії (FACSCalibur; "BD Biosciences").

Як показано на фігурі 1 (n=1 від кожного донора), Т-лімфоцити людини, що отримані з периферичної крові, не стимульовані/в стані спокою, що не експресують ніяких CD134, однак CD3<sup>+</sup>Т-лімфоцити людини, стимульовані РНА, експресують на своїй поверхні CD134 із залежністю від дози. При впливі 10 мкг / мл РНА рівень експресії CD134 на активованих CD3<sup>+</sup>Т-лімфоцитах людини, мабуть, досягає плато в проміжку між "днем 1" і "днем 2", проте відсоток CD134<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>Т-лімфоцитів людини збільшується із залежністю від часу під час експерименту.

(b). Експресія CD134 на субпопуляції CD4 Т-лімфоцитах людини, стимульованих РНА

Генерували РНА-стимульовані (в концентрації 0 і 10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, що експресують CD134 людини. Клітини відбирали і поміщали при щільності  $1-2 \times 10^6$  клітин/мл в охолоджений льодом ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> з додаванням 10 % HPS (блокування рецепторів Fc $\gamma$ ; "BioWhittaker"). Клітини інкубували з розведеними 1:10 FITC-кон'югованими антитілами миші до CD4 ("BD Biosciences") або з розведеними 1:10 FITC-кон'югованими антитілами миші до CD8 ("BD Biosciences") у поєднанні з розведеними 1:10 комерційними PE-кон'югованими антитілами миші до CD134 людини-клон АСТ35 ("BD Biosciences") протягом 30 хвилин при температурі 4° C. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини фіксували в

2 % формальдегіді в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Зв'язування антитіл вимірювали за допомогою проточної цитометрії (FACSCalibur; "BD Biosciences").

Як показано на фігурі 2, експресія CD134 спостерігалася на стимульованих РНА CD4<sup>+</sup>Т-лімфоцитах людини, але не на спочиваючих CD4<sup>+</sup>Т-лімфоцитах людини. На РНА-активованих CD 8<sup>+</sup>Т-лімфоцитах людини був показаний низький рівень експресії CD134, і ніякої експресії CD134 не спостерігалася на спочиваючих CD8<sup>+</sup>Т-лімфоцитах людини.

(с). Зв'язування моноклональних антитіл миші до CD134 людини клонів 12Н3 і 20Е5 на РНА-стимульованих Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини.

Генерували РНА-стимульовані (в концентрації 10 мкг/мл протягом 2 днів; див. вище) Т-лімфоцити, що експресують CD134 людини. Клітини відбирали і поміщали при щільності 1-2 × 10<sup>6</sup> клітин/мл в охолоджений льодом ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> з додаванням 10 % HPS (блокування рецепторів Fcγ; "BioWhittaker"). Клітини інкубували з 0, 0,007, 0,02, 0,07, 0,2, 0,6, 1,9, 5,6, 16,7, 50,0 мкг/мл комерційного антитіла миші до CD134 людини-клону АСТ35 (антитіло миші-ізотип IgG1; "BD Biosciences") і самостійно згенерованого антитіла миші до CD134 людини-клону 12Н3 або клону 20Е5 - протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини додатково інкубували з розведеними 1:200 РЕ-кон'югованими антитілами кози до IgG миші ("Jackson ImmunoResearch") протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини інкубували з розведеними 1:20 FITC-кон'югованими антитілами миші до CD3 людини ("BD Biosciences") для виявлення Т-лімфоцитів протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини фіксували в 2 % формальдегіді в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Зв'язування антитіл вимірювали за допомогою проточної цитометрії (FACSCalibur; "BD Biosciences").

Як показано на фігурі 3 (середнє значення ± SD; результати, отримані для двох донорів), антитіла миші до CD134 людини клону АСТ35, клону 12Н3 і клону 20Н5 насичували молекули CD134 людини на поверхні РНА-стимульованих CD3<sup>+</sup>Т-лімфоцитах приблизно при 5,0-10,0 мкг/мл. На підставі даних для зазначених двох донорів половина максимального зв'язування спостерігалася при ≈ 0,5 мкг/мл для антитіла миші до CD134 людини клону 12Н3 і при ≈ 2,5 мкг/мл для антитіла миші до CD134 людини клону АСТ35 і клону 20Е5.

(d). Зв'язування моноклональних антитіл миші до CD134 людини клонів 12Н3 і 20Е5 на РНА-стимульованих CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup>Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини.

Генерували РНА-стимульовані (у концентрації 2 0 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, що експресують CD134 людини. Клітини відбирали і поміщали при щільності 1-2 × 10<sup>6</sup> клітин/мл в охолоджений льодом ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> з додаванням 10 % HPS (блокування рецепторів Fcγ; "BioWhittaker"). Клітини інкубували з 20,0 мкг/мл з контрольним антитілом миші ізотипу IgG1κ ("BD Biosciences") або з 20,0 мкг/мл моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 12Н3 або клону 20Е5 протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини додатково інкубували з розведеними 1:100 РЕ-кон'югованими антитілами кози до IgG миші ("Jackson ImmunoResearch") протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини інкубували протягом 30 хвилин при температурі 4° С з розведеними 1:20 FITC-кон'югованими антитілами миші до CD4 людини ("BD Biosciences") або розведеними 1:20 FITC-кон'югованими антитілами миші до CD 8 людини ("BD Biosciences") для виявлення субпопуляцій Т-лімфоцитів. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини фіксували в 2 % формальдегіді в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Зв'язування антитіл вимірювали за допомогою проточної цитометрії (FACSCalibur; "BD Biosciences").

Як показано на фігурі 4, моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 12Н3 або клону 20Е5 демонструвало позитивне забарвлення на субпопуляції активованих CD4<sup>+</sup>Т-лімфоцитів людини, і слабе забарвлення на субпопуляції активованих CD8<sup>+</sup>Т-лімфоцитів людини.

(е). Перехресна конкуренція немічених антитіл миші до CD134 людини клонів 12Н3 і 20Е5 з РЕ-кон'югованими комерційними антитілами миші до CD134 на стимульованих Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини.

Генерували РНА-стимульовані (в концентрації 10 мкг/мл або 20 мкг/мл протягом 4 днів або 1 дня, відповідно; див. вище) Т-лімфоцити, що експресують CD134 людини. Клітини відбирали і поміщали при щільності 1-2 × 10<sup>6</sup> клітин/мл в охолоджений льодом ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> з додаванням 10 % HPS (блокування рецепторів Fcγ; "BioWhittaker"). Клітини інкубували з 20 мкг/мл неміченого моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 12Н3 або з 10 мкг/мл неміченого клону 20Е5 протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Потім клітини інкубували з розведеними 1:20 РЕ-кон'югованими комерційними антитілами миші до CD134

людини клону АСТ35 ("BD Biosciences") або клону L106 ("BD Biosciences"; див. Також патент Godfrey) протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини фіксували в 2 % формальдегіді в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Зв'язування РЕ-кон'югованих комерційних антитіл до CD134

вимірювали за допомогою проточної цитометрії (FACSCalibur; "BD Biosciences").

Як показано на фігурі 5, попередня інкубація з неміченим антитілом миші до CD134 людини блокує зв'язування комерційного РЕ-кон'югованого антитіла миші до CD134 людини клону L106 з CD134 людини на РНА-стимульованих Т-лімфоцитах. Попередня інкубація з неміченим антитілом миші до CD134 людини клону 20Е5 в малому ступені блокує зв'язування комерційного РЕ-кон'югованого антитіла миші до CD134 людини клону L106 з CD134 людини на РНА-стимульованих Т-лімфоцитах. Попередня інкубація з неміченим антитілом миші до CD134 людини клону 20Е5 не демонструвала дії на зв'язування комерційного РЕ-кон'югованого антитіла миші до CD134 людини клону АСТ35 з CD134 людини на РНА-стимульованих Т-лімфоцитах.

Зазначені результати продемонстрували, що антитіло миші до CD134 людини клону 12Н3 специфічно розпізнавало CD134 людини (часткове блокування зв'язування клону L106) на РНА-стимульованих Т-лімфоцитах і зв'язувалося (ii) з епітопом на CD134 людини, що є несхожим з епітопом, який розпізнавався комерційним антитілом миші до CD134 людини клону L106. Зазначені результати також продемонстрували, що антитіло миші до CD134 людини клону 20Е5 (i) специфічно розпізнавало CD134 людини (слабке блокування зв'язування клону L106) на РНА-стимульованих Т-лімфоцитах і зв'язувалося (ii) з епітопом на CD134 людини, що є несхожим з епітопом, який розпізнавався комерційним антитілом миші до CD134 людини клону L106. Крім того, зазначені результати продемонстрували, що антитіло миші до CD134 людини клону 12Н3 і клону 20Е, мабуть, розпізнавали епітопи CD134 людини на РНА-стимульованих Т-лімфоцитах, які відрізнялися від епітопу, розпізнаваного комерційним антитілом миші до CD134 людини клону АСТ35. Крім того, зазначені результати продемонстрували, що антитіло миші до CD134 людини клону 12Н3 і клону 20Е, мабуть, розпізнавали несхожі епітопи CD134 людини (що підтверджується частковим блокуванням у порівнянні зі слабким блокуванням зв'язування L106, відповідно) на РНА-стимульованих Т-лімфоцитах.

(f). Одночасне зв'язування рекомбінантного ліганду ОХ40 людини і антитіл миші до CD134 людини клонів 12Н3 і 20Е5 на РНА-стимульованих Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини.

Генерували РНА-стимульовані (в концентрації 10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, що експресують CD134 людини. Клітини відбирали і поміщали при щільності 1-2 × 10<sup>6</sup> клітин/мл в охолоджений льодом ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> з додаванням 10 % HPS (блокування рецепторів Fcγ; "BioWhittaker"). Клітини інкубували з 10,0 мкг/мл рекомбінантного ліганду ОХ40 людини з поліістидиновою міткою (ОХ40L; "R&D Systems") у поєднанні з 50,0 мкг/мл антитіла до поліістидину (IgG<sub>1</sub>, миші-клон AD 1.1.10; "R&D Systems") протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини потім інкубували з розведеними 1:100 FITC-кон'югованими антимишачими антитілами кози до IgG ("Jackson ImmunoResearch") протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub>, клітини інкубували з 10,0 мкг/мл біотинилуванням (із застосуванням N-гідроксисукцинімідо-біотину від компанії "Pierce") моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 12Н3 або клону 20Е5 протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини інкубували з розведеним 1:100 РЕ-кон'югованим стрептавідином ("Jackson ImmunoResearch") протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини фіксували в 2 % формальдегіді в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Зв'язування ОХ40 людини з антитілами до CD134 людини вимірювали за допомогою проточної цитометрії (FACSCalibur; "BD Biosciences").

Як показано на фігурі 6, і моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 12Н3, і моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 20Е5 одночасно зв'язувалися з ОХ40L людини на РНА-стимульованих Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини. Це вказує на те, що моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 12Н3 і клону 20Е5 не взаємодіють з епітопами в межах області зв'язування ОХ40L на рецепторах CD134 людини. Даний результат відрізняється від результату для комерційного моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону L106 (Стенфордський університет/патент Godfrey EP 0,726,952 B1), яке розпізнавало епітоп в межах області зв'язування ОХ40L рецепторів CD134 людини (Taylor and Schwarz. J Immunol Methods 2001; 255: 67-72; Kirin & La Jolla Institute/патент Croft WO 2007/062235 A2).

(g). Експресія CD134 на ефекторних та регуляторних Т-лімфоцитах людини після стимуляції стимулюючими гранулами з антитілами миші проти CD3 людини / CD28 людини.

CD4 Т-лімфоцити людини очищували із сукупності PBMC за допомогою позитивного відбору із застосуванням кон'югованих з мікрогранулами антитіл миші до CD4 людини ("Miltenyi Biotec") і магніту VarioMACS™/колонок LS ("Miltenyi Biotec"). Потім зазначені CD4 Т-лімфоцити забарвлювали FITC-кон'югованими антитілами миші до CD4 людини ("Dako") і PE-кон'югованими антитілами миші до CD25 людини ("BD Biosciences"). CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>барати</sup> традиційні ефекторні Т-лімфоцити (Теф) і CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>барати</sup> регуляторні Т-лімфоцити (Трег) сортували за допомогою проточно-цитометричного клітинного сортувальника ("Beckman-Coulter"). Це призводило до збагачення >95 % Теф і >95 % Трег. Теф і Трег поміщали при щільності  $2,5 \times 10^5$  клітин/мл у живильне середовище RPMI-164/глутамакс ("Gibco") з додаванням 0,02 mM пірувату ("Gibco"), 100 Од/мл пеніциліну ("Gibco"), 100 мкг/мл стрептоміцину ("Gibco") і 10 % інактивованої нагріванням HPS ((HPS; із LMI). Потім клітини висівали при щільності  $2,5 \times 10^4$  клітин/200 мкл/лунку в планшеті на 96 лунок з круглим дном ("Greiner") і стимулювали стимулюючими гранулами з антитілами миші на CD3 людини/ CD28 людини (гранули анти-CD3/CD28; "Invitrogen") у співвідношенні 1 гранула/2 клітини в присутності 25 Од/мл рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини (Proleukin® від компанії "Novartis Pharmaceuticals UK Ltd"), і культивували при температурі 37° C/5 % CO<sub>2</sub> протягом 2-8 днів. Після культивування клітини відбирали і поміщали при щільності  $1-2 \times 10^6$  клітин/мл в охолоджений льодом ФСБ/0,2 % БСА і одночасно забарвлювали розведеними 1:50 FITC-кон'югованими антитілами миші до CD4 людини ("Dako"), розведеними 1:10 PE-кон'югованими антитілами миші до CD 25 людини ("BD Biosciences"), розведеними 1:50 ECD™-кон'югованими антитілами миші до CD3 людини ("Beckman-Coulter"), розведеними 1:10 PE-Cy™<sup>5</sup>-кон'югованими антитілами миші до CD134 людини (клон ATC35; "BD Biosciences") і розведеними 1:10 PE-Cy™<sup>7</sup>-кон'югованими антитілами миші до CD127 людини ("BD Biosciences"). Зв'язування антитіл вимірювали за допомогою проточної цитометрії (FACSCalibur; "BD Biosciences").

Як показано на фігурі 7 (n=1 від кожного донора), Теф і Трег периферичної крові людини, очищені і нестимульовані/спочиваючі (день 0), що не експресують CD134, однак Теф і Трег людини, стимульовані анти-CD3/анти-CD28-гранулами експресують на своїй поверхні CD134. Експресія CD134 на активованих Теф і Трег людини досягають максимуму після 2 днів культивування і знижується після 5 і 8 днів культивування.

Приклад 3. Опис біологічних властивостей моноклональних антитіл миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5.

(а). Проліферація РНА-стимульованих Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини, після обробки антитілами миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5.

Генерували РНА-стимульовані (в концентрації 0 і 10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, що експресують CD134 людини. Клітини відбирали і суспендували з щільністю  $1-2 \times 10^6$  клітин/мл у живильному середовищі RPMI ("Gibco"), що містить 10 % фетальної сироватки телят (Bodinco) і 50 мкг/мл гентаміцину ("Gibco"). Потім клітини розсіювали при щільності  $0,1 \times 10^6$  клітин/100 мкл/лунку в планшеті на 96 лунок з плоским дном ("Corning") і впливали на них 0, 0,025, 0,25, 2,5, або 25, 0 мкг/мл моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 12H3 або моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 20E5, та/або в поєднанні з 0, 0,01, 0,1 або 1,0 мкг/мл рекомбінантного ОХ40L людини з полігістидиновою міткою (у присутності антитіла миші до полілізину в мольному співвідношенні 1:5; "R&D Systems") при температурі 37° C /5 % CO<sub>2</sub> протягом 6 днів. Через 6 днів проліферацію клітин вимірювали за допомогою колориметричного ELISA™ для оцінки проліферації клітин (з включенням BrdU) ("Roche") і рідера для ELISA ("BioRad") на довжині хвилі 450 нм.

Як показано на фігурі 8 (середнє значення  $\pm$  SD, n=4 від одного донора), моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 12H3 і моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 20E5 в залежності від індукованої дози викликало проліферацію РНА-стимульованих Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини. Моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 12H3 в залежності від індукованої дози викликало проліферацію при концентрації 0, 25, 2, 5 і 25 мкг/мл. Моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 12H3 в залежності від індукованої дози викликало проліферацію при концентрації 2, 5 і 25 мкг/мл. Крім того, ОХ40L людини в залежності від індукованої дози викликало проліферацію РНА-стимульованих Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини. ОХ40L людини викликав проліферацію при концентраціях 0,1 і 1,0 мкг/мл. Спочиваючі (без стимуляції РНА) CD134<sup>негативні</sup> Т-лімфоцити людини не демонстрували ніяких реакцій проліферації після обробки моноклональним антитілом миші до CD134 людини клону 12H3, моноклональним антитілом миші до CD134 людини клону 20E5 або ОХ40L людини (дані не показані).

Як показано на фігурі 9 (середнє значення  $\pm$  SD,  $n=2$  від одного донора), моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 12H3 (при концентрації 2,5 і 25 мкг/мл) і моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 20E5 (при концентрації 2,5 і 25 мкг/мл), а також OX40L людини (при концентрації 1,0 мкг/мл) викликали проліферацію PHA-стимульованих Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини. Необроблений контроль (тільки середовище) або контроль, оброблений антитілом миші ізотипу IgG1к $\alpha$  (при концентрації 2,5 і 25 мкг/мл; "BD Biosciences"), що не демонстрували ніякої дії на проліферацію PHA-стимульованих Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини. Поєднання моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 12H3 в концентрації 2,5 і 25 мкг/мл (або при більш низьких концентраціях; дані не показані) або моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 20E5 в концентрації 2,5 і 25 мкг/мл (або при більш низьких концентраціях; дані не показані) з OX40L людини в концентрації 1,0 мкг/мл (або при більш низьких концентраціях; дані не показані) не демонструє жодних взаємних впливів (тобто, синергічної або адитивної, або навіть інгібуючої дії) на проліферацію PHA-стимульованих Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини.

(b). Проліферація стимульованих гранулами з антитілами до CD3/CD28 людини ефекторних та регуляторних Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини, після обробки антитілами миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5.

CD4 Т-лімфоцити людини очищали з сукупності PBMC за допомогою негативного відбору із застосуванням коктейлю антитіл миші ("BD Biosciences"), направлених на CD8 (клон RPA-T8), CD14 (клон M5E2), CD16 (клон 3G8), CD19 (клон 4G7), CD33 (клон P67.6), CD56 (клон B159) і CD235 а людини (HIR2). Після інкубації з Dynabeads®-кон'югованими антитілами вівці до IgG миші ("Invitrogen"), такі що не зв'язалися CD4 Т-лімфоцити відбирали з концентратора магнітних частинок для динамічного аналізу MPC™-6 ("Invitrogen"). З вказаної сукупності збагачених CD4 Т-лімфоцитів CD25<sup>бараті</sup> Трег і CD25<sup>негативні</sup> Теф виділяли за допомогою MACS-сортування із застосуванням 10 мкл кон'югованих з мікрогранулами антитіл миші до CD25 людини ("Miltenyi Biotec")/10<sup>7</sup> клітин і магніту MiniMACS™/колонок MS ("Miltenyi Biotec") і VarioMACS™/магніту/колонок LS ("Miltenyi Biotec"). Це призводило до збагачення >90 % Теф і >90 % Трег. Теф і Трег поміщали при щільності 0,25  $\times$  10<sup>6</sup> клітин/мл у живильне середовище RPMI-1640/глутамакс ("Gibco") з додаванням 0,02 м пірувату ("Gibco"), 100 од/мл пеніциліну ("Gibco"), 100 мкг/мл стрептоміцину ("Gibco") і 10 % термоінактивованої HPS<sub>i</sub>. Потім Теф і Трег розсіювали при щільності 2,5  $\times$  10<sup>4</sup> клітин/200 мкл/лунку (тобто, 0,125  $\times$  10<sup>6</sup> клітин/мл) в планшеті на 96 лунок з круглим дном ("Greiner") і стимулювали анти-CD3/CD28 гранулами ("Invitrogen") у співвідношенні 1 гранула/5 клітин з додаванням або без додавання 5,0 мкг/мл моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 12H3, 5,0 мкг/мл моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 20E5, 1,0 мкг/мл рекомбінантного OX40L людини з поліістидиновою міткою (у присутності антитіла миші до полілізину в мольному співвідношенні 1:5; "R&D Systems"), поєднання 5,0 мкг/мл моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 12H3 з 1,0 мкг/мл рекомбінантного OX40L людини з поліістидиновою міткою (у присутності антитіла миші до полілізину в мольному співвідношенні 1:5) або поєднання 5,0 мкг/мл моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 20E5 з 1,0 мкг/мл рекомбінантного OX40L людини з поліістидиновою міткою (у присутності антитіла миші до полілізину в мольному співвідношенні 1:5) при температурі 37° C/5 % CO<sub>2</sub> протягом 4 або 5 днів. Через 4 або 5 днів проліферацію клітин вимірювали по включенню тимідину, міченого тритієм 0,5 мкКю, ("Perkin & Elmer") за допомогою  $\beta$ -лічильника ("Canberra-Packard").

Як показано на фігурі 10 (середнє значення  $\pm$  SD), хоча анти-CD3/CD28 стимулюючі гранули самі по собі викликали значну проліферацію Теф людини, що експресують CD134 людини (тобто, середовище), моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 12H3 або OX40L людини викликали додаткову проліферацію стимульованих анти-CD3/CD28 гранулами Теф людини, що експресують CD134 людини. Моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 20E5 не викликало додаткової проліферації стимульованих анти-CD3/CD28 гранулами Теф людини, що експресують CD134 людини.

Як показано на фігурі 11 (середнє значення  $\pm$  SEM від 5 донорів), моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 12H3 і моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 20E5 не викликали або викликали лише незначну проліферацію стимульованих анти-CD3/CD28 гранулами Трег людини, що експресують CD134 людини, тоді як OX40L людини викликав дуже сильну проліферацію стимульованих анти-CD3/CD28 гранулами Трег людини, що експресують CD134 людини.

Як показано на фігурі 12A (середнє значення  $\pm$  SD), моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 12H3 в поєднанні з OX40L людини не демонстрували ніяких взаємних впливів (тобто, синергічної або адитивної, або навіть інгібуючої дії) на стимульовані анти-CD3/CD28

гранулами Трег людини, що експресують CD134 людини. Крім того, моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 20E5 в поєднанні з OX40L людини не демонстрували ніяких взаємних впливів (тобто, синергічної або адитивної, або навіть інгібуючої дії) на стимульовані анти-CD3/CD28 гранулами Трег людини, що експресують CD134 людини (дані не показані).

5 Як показано на фігурі 12B (середнє значення  $\pm$  SD), на відміну від дії, що спостерігається з проліферативними реакціями, що опосередковані OX40L людини, в стимульованих анти-CD3/CD28 гранулами Теф, що експресують CD134 людини, моноклональні антитіла миші до CD134 людини клону 12H3 суттєво пригнічують опосередковувані OX40L людини проліферативні проліферативними реакціями, опосередкованими OX40L людини, в стимульованих анти-CD3/CD28 гранулами Трег, що експресують CD134 людини.

10 (с). Супресорна функція стимульованих гранулами з антитілами до CD3/CD28 людини Т-регуляторних лімфоцитів, що експресують CD134 людини, після обробки антитілами миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5.

15 CD4 Т-лімфоцити людини очищали із сукупності PBMC, і Теф і Трег збагачували, як описано в Прикладі 3(b), що наведено вище. Теф і Трег поміщали при щільності  $0,25 \times 10^6$  клітин/мл у живильне середовище RPMI-1640/глутамакс ("Gibco") з додаванням 0,02м пірувату ("Gibco"), 100 од/мл пеніциліну ("Gibco"), 100 мкг/мл стрептомицину ("Gibco") і 10 % HPS. Потім Теф розсіювали при щільності  $2,5 \times 10^4$  клітин/200 мкл/лунку (тобто,  $0,125 \times 10^6$  Теф/мл) і культивували їх спільно з супресорними Трег з щільністю  $0,25 \times 10^4$  супресорних Трег/200 мкл/лунку (тобто,  $0,125 \times 10^6$  Трег/мл; співвідношення Теф/Трег = 1:1) в планшетах на 96 лунок з круглим дном ("Greiner"). Зазначені спільні культури Теф/Трег стимулювали гранулами анти-CD3/CD28 ("Invitrogen") в концентрації 1 гранула/10 клітин з додаванням або без додавання 5,0 мкг/мл моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 12H3, 5,0 мкг/мл моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 20E5 і 1,0 мкг/мл рекомбінантного OX40L людини з полігістидиновою міткою (у присутності антитіла миші до полілізину в мольному співвідношенні 1:5; "R&D Systems") при температурі 37° C/5 % CO<sub>2</sub> протягом 5 днів. Через 5 днів проліферацію клітин вимірювали по включенню тимідину, міченого тритієм 0,5 мкКю, ("Perkin & Elmer") за допомогою  $\beta$ -лічильника ("Canberra-Packard").

20 Як показано на фігурі 13 (середнє значення  $\pm$  SD), Трег людини придушували проліферативні реакції в Теф людини, що індуковані анти-CD3/CD28 гранулами (тобто, середовищем). Зазначена супресорна функція Трег людини послаблювалася у присутності моноклональних антитіл миші до CD134 людини клону 12H3 або в присутності OX40L людини. Моноклональні антитіла миші до CD134 людини клону 20E5 не демонстрували ніякої дії на супресорну функцію Трег людини.

25 Приклад 4. Опис молекулярно-генетичних властивостей моноклональних антитіл миші до CD134 людини клонів 20E5 і 12H3.

(а). Ізотипування і розщеплення білків по Едману.

30 Клас імуноглобулінів миші і тип легких ланцюгів в моноклональних антитілах миші до CD134 людини клонів 20E5 і 12H3, очищених за допомогою білка G, визначали за допомогою набору для ізотипування моноклональних антитіл миші IsoStrip™, і було показано, що обидва моноклональних антитіла миші до CD134 людини клонів 20E5 і 12H3 являються IgG1 миші з легкими ланцюгами.

35 Після стандартного електрофорезу LDS-PAGE із застосуванням системи NuPage® Novex® заводського гелю ("Invitrogen") при умовах відновлювання (дитіотреїтолу і нагрівання до температури 70° C) моноклональне антитіло миші до CD134 людини клону 20E5 піддавали електроблоттингу в мембрану з полівініліденфторидом для переносу (PDVF/Immobilon-P) і забарвлювали кумасі діамантовим блакитним ("BioRad"). Потім смуги важких і легких ланцюгів (50 кДа і 25 кДа, відповідно) вирізали з PVDF мембрани і застосовували для аналізу на основі розщеплювання білків по Едманду (проведеного компанією "Eurosequence", Гронінген, Нідерланди) з метою визначення послідовностей амінокислот з N-кінця. Результати показані під номерами SEQ ID №3 і SEQ ID №61 для моноклонального антитіла миші до CD134 людини клону 20E5. Було визначено одинадцять амінокислот на N-кінці важких ланцюгів і 11 амінокислот на N-кінці легких ланцюгів.

(б). ПЛР-РВ.

40 Клітини гібридами клону 20E5 і 12H3 відбирали з культури клітин. Клітини відмивали ФСБ, відбирали аліквоти у флакони, що містять  $5 \times 10^6$  клітин, і зберігали у вигляді гранул при температурі -80° C. Гранули з клітинами застосовували для виділення РНК за допомогою набору RNeasy Mini Isolation ("QIAGEN"). Визначали концентрацію РНК (довжина хвилі 260 нм), і РНК зберігали при температурі -80° C. Сумарний вихід виділеної РНК: 27,3 мкг і 58,4 мкг для клону 20E5 і клону 12H3, відповідно (співвідношення A260/A280 для обох клонів 1,9). З 1мкг РНК

за допомогою зворотної транскриптази синтезували кДНК, з застосуванням набору для синтезу кДНК RevertAid™ H Minus First Strand ("Fermentas") і зберігали її при температурі -20° С.

На підставі ізотипу (каппа/IgG1 миші) і даних, що отримані при розщепленні по Едманду моноклонального антитіла до CD134 людини клону 20E5, для ампліфікації V-областей моноклонального антитіла до CD134 людини клону 20E5 були розроблені наступні праймери:

№ праймера *	Послідовність **	SEQ ID №	Напрямок	Ген
201	GACAGTTGGTGCAGCATCAG	39	антисмисловий	mkappa
266	CACTGGATGGTGGGAAGATG	40	антисмисловий	mkappa
203	GGCCAGTGGATAGACAGATG	41	антисмисловий	mlgG1
204	TGGACAGGGATCCAGAGTTC	42	антисмисловий	mlgG1
259	GCGAAGTACAAYTNCARCARWSNNGG	43	такий що кодує	20E5HC
260	GCGTACAATTACARCARWSNNGNCC	44	такий що кодує	20E5HC
265	GCGATATACARATGACNCARAC	45	такий що кодує	20E5LC

\* номер відповідно до внутрішньої системи кодування "Biosceros";

\*\* вироджені праймери: N=A, C, G або T, Y=C або T, R=A або G, W=A або T, а S=G або C.

На підставі ізотипу (каппа/IgG1 миші) моноклонального антитіла до CD134 людини клону 12H3 і таких що кодують праймерів, що відпалюються з кДНК, що кодує сигнальні пептиди миші (частково на підставі Antibody Engineering Volume 1 Kontermann, Roland E.; Dübel, Stefan (Eds.), Springer LabManuals, 2nd ed., 2010), для ампліфікації V-областей моноклонального антитіла до CD134 людини клону 12H3 були розроблені наступні праймери:

№ праймера*	Послідовність **	SEQ ID №	Напрямок	Ген
416	CAGTGGATAGACAGATGGGGG	46	антисмисловий	mlgG1
394	ACTGGATGGTGGGAAGATGG	47	антисмисловий	mkappa
405	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	48	такий що кодує	сигнальний пептид
410	ATGGRATGGAGCKGGGTCTTTMTCTT	49	такий що кодує	сигнальний пептид
389	ATGGGCWTCAAAGATGGAGTCACA	50	такий що кодує	сигнальний пептид

\* номер відповідно до внутрішньої системи кодування "Biosceros";

\*\* вироджені праймери: N=A, C, G або T, Y=C або T, R=A або G, W=A або T, S=G або C, M=C або A, а K=G або T.

Праймери 201 і 266 являються антисмисловими і розроблені для відпалювання в межах константної області гену карра миші в положенні 214-232 і 236-255, відповідно (на підставі номера доступу V00807 [версія V00807.1]).

Праймери 203 і 204 являються антисмисловими і розроблені для відпалювання в межах константної області IgG1 миші в положенні 115-134 і 221-240, відповідно (на підставі номера доступу J00453 [версія J00453.1]).

Праймери 259 і 260 являються кодуючими виродженими праймерами (виродження, оответственно 512 і 256) і відпалюються на N-кінці (амінокислоти 1-8 та 2-9, відповідно) важкого ланцюга антитіла миші до CD134 людини клону 20E5 на підставі даних розщеплення по Едману.

Праймер 265 являється кодуючим виродженим праймером (виродження 16) і відпалюється на N-кінці (амінокислоти 1-7) легкого ланцюга антитіла миші до CD134 людини клону 20E5 на підставі даних розщеплення по Едману.

Праймер 416 являється антисмисловим і розроблений для відпалювання в межах константної області IgG1 в положеннях 111-131 (на підставі номера доступу J00453 [версія J00453.1]).

Праймер 394 являється антисмисловим і розроблений для відпалювання в межах константної області гену карра миші в положенні 115-134 і 221-240 235-254 (на підставі номера доступу V00807 [версія V00807.1]).

Праймери 389, 405 і 410 являються виродженими праймерами (виродження, відповідно 2, 8 і 8) і відпалюються з послідовностями сигнальних пептидів антитіл миші. Праймер 389 був розроблений для легкого ланцюга, праймери 405 і 410 - для важкого ланцюга.

Праймери 201, 266, 203, 204, 259, 260 і 265 застосовували в різних поєднаннях для ампліфікації варіабельних областей антитіла миші до CD134 людини клону 20E5, а праймери 416, 394, 405, 410 і 389 застосовували в різних поєднаннях для ампліфікації варіабельних областей антитіла миші до CD134 людини клону 12H3. Проводили різні варіанти ПЛР із застосуванням згенерованих кДНК в якості матриці.

Для ампліфікації варіабельних областей важких і легких ланцюгів антитіл миші до CD134 як клону 20E5, так і клону 12H3 застосовували ДНК-полімеразу Accuprime™ Pfx ("Invitrogen"). Продукти ПЛР аналізували на 1 % агарозному гелі. Продукти ПЛР очищали від гелю і клонували у вектор ПЛР з тупими кінцями II-ТОPO® для аналізу послідовності. Для плазмід, що містять ПЛР-вставки, ці клоновані вставки аналізували за допомогою секвенування ДНК (проводила компанія "ServicXS B.V.", Лейден, Нідерланди, або компанія "Macrogen", Амстердам, Нідерланди) із застосуванням T7 для отримання консенсусної послідовності для V-областей антитіла миші до CD134 клону 20E5 і клону 12H3. Для антитіла миші до CD134 клону 20E5 було отримано одинадцять реакцій інформативних послідовностей важкого ланцюга і 3 реакції інформативних послідовностей легкого ланцюга. Для антитіла миші до CD134 клону 12H3 було отримано п'ять реакцій інформативних послідовностей важкого ланцюга і 3 реакції інформативних послідовностей легкого ланцюга. На підставі зазначеної інформації були визначені консенсусні послідовності V-областей обох антитіл (див. SEQ ID № 4, 5, 12 і 13).

Перелік або обговорення раніше опублікованого документа в даному описі мабуть не обов'язково має розглядатися як визнання того, що даний документ являється частиною рівня техніки або загальновідомих фактів.

Приклад 5. Генерування химерних моноклональних антитіл до CD134 людини клонів 20E5 і 12H3 з IgG4/каппа людини і IgG1/каппа людини (тобто, із заміною константних доменів миші на константні домени IgG/каппа людини).

На підставі визначених V-областей в антитілах миші (див. Приклад 4(b), що наведено вище) до CD134 клонів 20E5 і 12H3, був створений дизайн для генерування химерних версій антитіл людини. З цією метою в компанії GENEART (Регенсбург, Німеччина) були замовлені послідовності кДНК, які оптимізовані для клітин CHO (див. SEQ ID №20 (такий що кодує химерний важкий ланцюг IgG4 людини клону 20E5), SEQ ID №21 (такий що кодує химерний легкий ланцюг к-клону 20E5), SEQ ID №22 (такий що кодує химерний важкий ланцюг IgG1 людини клону 20E5), SEQ ID №23 (такий що кодує химерний важкий ланцюг IgG4 людини клону 12H3) і SEQ ID №24 (такий що кодує химерний легкий ланцюг к-клону 12H3)), які кодували сигнальний пептид миші, що йде або після варіабельного легкого ланцюга, пов'язаного з константною областю каппа людини, або після варіабельного важкого ланцюга, пов'язаного з константною областю IgG людини. Такий дизайн був виконаний для обох антитіл; для клону 20E5 варіабельний важкий ланцюг був пов'язаний з константною областю IgG4 людини або IgG1 людини; для клону 12H3 варіабельний важкий ланцюг був пов'язаний з константною областю IgG4 людини. За допомогою відповідних рестриктаз згенеровані кДНК субклонували в плазмиди експресії, що отримані з pcDNA3.1. Химерні антитіла експресували за допомогою системи експресії FreeStyle™ MAX CHO (клітини CHO-S) ("Invitrogen"). Експресовані антитіла очищали за допомогою афінної хроматографії на колонках з білком А ("GE Healthcare"). Послідовності химерних антитіл показані під номерами SEQ ID №25, 26, 27, 28 і 29.

Приклад 6. Характеристики зв'язування химерних моноклональних антитіл до CD134 людини клону 20E5, що містять IgG4/каппа людини і IgG1/каппа людини.

(а). Характеристики зв'язування химерних моноклональних антитіл до CD134 людини клону 20E5, що містять IgG4/к, людини на РНА-стимульованих CD4+Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини.

Генерували РНА-стимульовані (в концентрації 10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, що експресують CD134 людини. Клітини відбирали і поміщали при щільності  $1-2 \times 10^6$  клітин/мл в охолоджений льодом ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub>. Клітини інкубували з 0, 0,007, 0,02, 0,07, 0,2, 0,6, 1,9, 5,6, 16,7, 50,0 мкг/мл химерного антитіла до CD134 людини клону 20E5, що містить IgG4к -людини, протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини додатково інкубували з розведеними 1:50 FITC-кон'югованими антитілами миші до IgG4 людини ("Sigma") протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини інкубували з розведеними 1:10 РЕ-кон'югованими антитілами миші до CD4 людини ("BD Biosciences") протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини фіксували в 2 %

формальдегіді в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Зв'язування антитіл вимірювали за допомогою проточної цитометрії (FACSCalibur; "BD Biosciences").

Химерне антитіло з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 насичувало молекули CD134 людини на поверхні РНА-стимульованих CD4+Т-лімфоцитів приблизно при 5,0-10,0 мкг/мл (дані не показані). Напівмаксимальне зв'язування спостерігалось при концентрації химерного антитіла з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5  $\approx$  1.0 мкг/мл (дані не показані).

(b). Зв'язування химерних моноклональних антитіл до CD134 людини клону 20E5, що містять IgG4к людини, на РНА-стимульованих CD4+ і CD8+Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини.

Генерували РНА-стимульовані (в концентрації 10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, що експресують CD134 людини. Клітини відбирали і поміщали при щільності  $1-2 \times 10^6$  клітин/мл в охолоджений льодом ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub>. Клітини інкубували з 20,0 мкг/мл химерного антитіла до CD134 людини клону 20E5, що містить IgG4к людини, або без зазначеного антитіла протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини додатково інкубували протягом 30 хвилин при температурі 4° С з розведеними 1:200 РЕ-кон'югованими антитілами кози до IgG людини (Fc $\gamma$ -специфічними) ("Jackson ImmunoResearch"). Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини інкубували з розведеними 1:10 FITC-кон'югованими антитілами миші до CD4 людини ("BD Biosciences") або розведеними 1:10 FITC-кон'югованими антитілами миші до CD8 людини ("BD Biosciences") для виявлення субпопуляцій Т-лімфоцитів. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини фіксували в 2 % формальдегіді в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Зв'язування антитіл вимірювали за допомогою проточної цитометрії (FACSCalibur; "BD Biosciences").

Химерне антитіло з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 демонструвало позитивне забарвлення в субпопуляції РНА-стимульованих CD4+Т-лімфоцитів людини і слабо виражене позитивне забарвлення в субпопуляції РНА-стимульованих CD8+Т-лімфоцитів людини (дані не показані).

(c). Зв'язування химерних моноклональних антитіл до CD134 людини клону 20E5, що містять IgG4к людини, на стимульованих стимулюючими гранулами з антитілом проти CD3/CD28 людини CD4+ і CD8+Т-лімфоцитах, що експресують CD134 людини.

Мононуклеарні клітини периферичної крові людини (PBMC), що отримані від здорових донорів (отримані за інформованою згодою), виділяли за допомогою центрифугування в градієнті щільності на Lymphoprep (1.077 г/мл; "Nycomed"). Потім клітини при щільності  $1 \times 10^6$  PBMC/мл у живильному середовищі RPMI-1640 ("Gibco"), що містить 10 % фетальної сироватки телят ("Bodinco") і 50 мкг/мл гентаміцину ("Gibco"), стимулювали стимулюючими гранулами з антитілами миші до CD3/CD28 (гранули анти-CD3/CD28; "Invitrogen") у кількості 1 гранула/4 клітини у відсутності або присутності 25 од/мл рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини ("PeproTech") при температурі 37° С/5 % CO<sub>2</sub> протягом 1 дня. Після культивування PBMC відбирали і поміщали при щільності  $1-2 \times 10^6$  клітин/мл в охолоджений льодом PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>. Клітини інкубували з додаванням або без додавання 20,0 мкг/мл химерного антитіла з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини додатково інкубували з розведеними 1:200 РЕ-кон'югованими антитілами кози до IgG людини (Fc $\gamma$ -специфічними) ("Jackson ImmunoResearch"). Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини протягом 30 хвилин при температурі 4° С інкубували з розведеними 1:10 FITC-кон'югованими антитілами миші до CD4 людини ("BD Biosciences") або розведеними 1:10 FITC-кон'югованими антитілами миші до CD8 людини ("BD Biosciences") для виявлення субпопуляцій Т-лімфоцитів. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини фіксували в 2 % формальдегіді в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Зв'язування антитіл вимірювали за допомогою проточної цитометрії (FACSCalibur; "BD Biosciences").

Як показано на фігурі 14, химерне антитіло з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 демонструвало позитивне забарвлення в субпопуляції стимульованих анти-CD3/CD28 гранулами CD4+Т-лімфоцитів людини і слабо виражене позитивне забарвлення в субпопуляції стимульованих анти-CD3/CD28 гранулами CD8+Т-лімфоцитів людини. При додаванні рекомбінантного IL-2 людини ніякого явного ефекту не спостерігалось.

Приклад 7. Опис біологічних властивостей химерних антитіл до CD134 людини клону 20E5, що містять IgG4/каппа людини.

(a). Проліферація РНА-стимульованих Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини, після обробки химерними антитілами з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5.

Генерували РНА-стимульовані (10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, що експресують CD134 людини. Клітини відбирали і суспендували з щільністю  $2 \times 10^6$  клітин/мл у живильному середовищі RPMI ("Gibco"), що містить 10 % фетальної сироватки телят ("Bodinco") і 50 мкг/мл гентаміцину ("Gibco"). Клітини розсіювали при щільності  $0,1 \times 10^6$  клітин/100 мкл/лунку у планшети на 96 лунок з плоским дном ("Corning") і впливали на них 25,0 мкг/мл химерного антитіла з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 або 25,0 мкг/кг контрольного антитіла з IgG4к людини до CD40 людини (PG102; "Pangenetics"), або 1,0 мкг/мл рекомбінантного OX40L людини з полігістидиновою міткою (у присутності антитіла миші до полілізину в мольному співвідношенні 1:5; "R&D Systems") при температурі 37° С /5 % CO<sub>2</sub> протягом 6 днів. Через 6 днів проліферацію клітин вимірювали за допомогою колориметричного ELISA™ для оцінки проліферації клітин (з включенням BrdU) ("Roche") і рідера для ELISA ("BioRad") на довжині хвилі 450 нм.

Як показано на фігурі 15 (середнє значення  $\pm$  SD), химерне антитіло з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 (hu20E5) і OX40L людини викликали проліферацію РНА-стимульованих Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини. Відсутність обробки (тільки середовище) або обробка контрольним антитілом з IgG4к до CD40 людини (hulG4) не демонстрували ніякої дії на РНА-стимульовані Т-лімфоцити, що експресують CD134 людини.

(b). Проліферація РНА-стимульованих Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини, після обробки химерними моноклональними антитілами з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 в поєднанні з рекомбінантним OX40L людини.

Генерували РНА-стимульовані (10 мкг/мл протягом 1 дня; див. вище) Т-лімфоцити, що експресують CD134 людини. Клітини відбирали і суспендували з щільністю  $2 \times 10^6$  клітин/мл у живильному середовищі RPMI ("Gibco"), що містить 10 % фетальної сироватки телят ("Bodinco") і 50 мкг/мл гентаміцину ("Gibco"). Клітини розсіювали при щільності  $0,1 \times 10^6$  клітин/100 мкл/лунку (тобто,  $1 \times 10^6$  клітин/мл) в планшети на 96 лунок з плоским дном ("Corning") і впливали на них 0, 0,025, 0, 25, 2,5, або 25,0 мкг/мл химерного антитіла з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 та/або в поєднанні з 0, 0,01, 0,1 або 1,0 мкг/мл рекомбінантного OX40L людини з полігістидиновою міткою (у присутності антитіла миші до полілізину в мольному співвідношенні 1:5; "R&D Systems") при температурі 37° С/5 % CO<sub>2</sub> протягом 6 днів. Через 6 днів проліферацію клітин вимірювали за допомогою колориметричного ELISA™ для оцінки проліферації клітин (з включенням BrdU) ("Roche") і рідера для ELISA ("BioRad") на довжині хвилі 450 нм.

Як показано на фігурі 16 (середнє значення  $\pm$  SD), химерне антитіло з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 (hu 20E5) і OX40L людини викликали дозозалежну проліферацію РНА-стимульованих Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини. Химерне антитіло з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 із залежністю від донора викликало проліферацію при 2,5 і 25 мкг/мл (донор 1) або при 0,25, 2,5 і 25 мкг/мл (донор 2). Крім того, OX40L людини із залежністю від донора викликав проліферацію при 0,1 і 1,0 мкг/мл (донор 1) або при 0,01, 0,1 і 1,0 мкг/мл (донор 2).

Як показано на фігурі 17 (середнє значення  $\pm$  SD), поєднання химерного антитіла з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 (hu 20E5) при 2,5 і 25 мкг/мл (або при більш низькій концентрації; дані не показані) з OX40L людини при 0,1 і 1,0 мкг/мл (або при більш низькій концентрації; дані не показані) не робило ніяких взаємних впливів (тобто, синергічної або адитивної, або навіть інгібуючої дії) на проліферацію РНА-стимульованих Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини.

(c). Проліферація стимульованих стимулюючими гранулами з антитілом до CD3/CD28 людини Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини, після обробки химерними моноклональними антитілами з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5.

Мононуклеарні клітини периферичної крові людини (PBMC), що отримані від здорових донорів (отримані за інформованою згодою), виділяли за допомогою центрифугування в градієнті щільності на Lymphoprep (1.077 г/мл; "Nycomed"). Потім PBMC розсіювали з щільністю  $0,1 \times 10^6$  клітин/100 мкл/лунку (тобто,  $1 \times 10^6$  клітин/мл) в планшети на 96 лунок з плоским дном в живильному середовищі RPMI-1640 ("Gibco"), що містить 10 % фетальної сироватки телят ("Bodinco") і 50 мкг/мл гентаміцину ("Gibco"), і стимулювали стимулюючими гранулами з антитілами миші до CD3/CD28 (гранули анти-CD3/CD28; "Invitrogen") у кількості 1 гранула/2 клітини у відсутності або присутності 25 од/мл рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини ("PeproTech") при температурі 37° С /5 % CO<sub>2</sub>. Через 1 день або 2 дні зазначені стимульовані стимулюючими CD3/CD28 гранулами Т-лімфоцити, що експресують CD134 людини, піддавали дії 25,0 мкг/мл химерного антитіла з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 або 1,0 мкг/мл рекомбінантного OX40L людини з полігістидиновою міткою (у присутності антитіла миші до

полілізіну в мольному співвідношенні 1:5; "R&D Systems ») при температурі 37° С /5 % CO<sub>2</sub> протягом 6 днів або 5 днів, відповідно. Клітини, які спочатку простимулювали поєднанням анти-CD3/CD28 гранул і рекомбінантним інтерлейкіном-2 людини, повторно стимулювали 25 К/мл рекомбінантного інтерлейкіну-2 людини за 1 день до оцінки проліферації. Через 6 днів або 5 днів впливу химерного антитіла з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 або рекомбінантного OX40L людини проліферацію клітин вимірювали за допомогою колориметричного ELISA™ для оцінки проліферації клітин (з включенням BrdU) ("Roche") і рідера для ELISA ("BioRad") на довжині хвилі 450 нм.

Як показано на фігурі 18 (середнє значення  $\pm$  SD, n=3 від одного донора), хоча стимулюючі гранули анти-CD3/CD28 самі по собі викликали значну проліферацію Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини (тобто, середовище), химерне антитіло з IgG4к людини до CD134 людини клону 20E5 (hu20E5) і OX40L людини викликали додаткову проліферацію стимульованих анти-CD3/CD28 гранулами Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини. Додавання тільки інтерлейкіну-2, мабуть, посилювало базальну проліферацію стимульованих анти-CD3/CD28 гранулами Т-лімфоцитів, що експресують CD134 людини.

(d). Імуностимулюючі реакції у мавп макака резус після лікування антитілами людини (химерними) до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5.

Нижчих приматів - макаку резус - можна імунізувати білком вірусу імунодефіциту мавп, gp130, як описано у Weinberg et al. (J Immunother 2006; 29: 575-585).

Очікувалося, що дренуючі лімфатичні вузли від імунізованих мавп, оброблені антитілами людини (наприклад, химерними, гуманізованими або деімунізованими антитілами; наприклад, підкласу IgG1 або IgG4) до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5, повинні демонструвати збільшення розмірів у порівнянні з лімфатичними вузлами контрольних імунізованих мавп. Очікується, що мавпи, які піддані впливу антитіл людини (наприклад, химерних, гуманізованих або деімунізованих антитіл) до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5, повинні демонструвати підвищення титру gp130-специфічних антитіл і підвищені довгострокові реакції Т-лімфоцитів у порівнянні з контролем. Явних ознак токсичності у відповідь на антитіла (наприклад, химерні, гуманізовані або деімунізовані антитіла) до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5 у мавп спостерігатися не повинно.

Приклад 8. Опис властивостей доменів і епітопів CD134 людини, які розпізнаються моноклональними антитілами до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5.

(a). Зв'язування моноклональних антитіл миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5 з не відновленим і відновленим рекомбінантним білком CD134 людини: Fc $\gamma$  людини (вестерн-блотинг).

1300 або 650 нг/доріжку (для забарвлення кумасі діамантовим блакитним) або 250 нг/доріжку (для вестерн-блотингу) рекомбінантного білка CD134 людини: Fc $\gamma$  людини (IgG1) ("R&D Systems") піддавали електрофорезу із застосуванням 4-12 % гелів Tris-Bis та рухомого буферу MOPS ("Invitrogen") при різних відновлюючих і не відновлюючих умовах (див. фігуру 19) в заводській системі для денатуруючого електрофорезу LDS-PAGE NuPage® Novex®. Потім рекомбінантний білок CD134 людини: Fc $\gamma$  людини або забарвлювали кумасі діамантовим блакитним ("BioRad"), або піддавали електроблотингу з перенесенням на мембрану з полівініліденоу фториду (PDVF) ("Millipore"). Після блокування ФCB/0,5 % Tween 20/1 % БСА фракції V ("Roche") протягом 20 хв при кімнатній температурі (КТ) мембрани з PDVF інкубували з 100 нг/мл моноклональних антитіл миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5 протягом 1 години при КТ. Паралельно в якості негативного контролю застосовували 100 нг/мл контрольних антитіл миші ізотипу IgG1к ("BD Biosciences"). Після активного промивання в ФCB/0,05 % Tween 20 зв'язування моноклональних антитіл миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5 визначали за допомогою інкубації з розведеними 1:5000 антимишачими Fc $\gamma$ -специфічними антитілами кози, кон'югованими з пероксидазою хрому ("Jackson ImmunoResearch") протягом 1 години при КТ, а після цього - з готовим до вживання розчином субстрату TMB (тетраметилбензідину) ("Sigma") для колориметричної детекції.

Як показано на фігурі 19-B, рекомбінантний білок CD134 людини: Fc $\gamma$  людини при невідновлювальних умовах (а також із LDS-денатурацією без теплової денатурації або з нею, умови а і b, відповідно) демонстрував молекулярну масу  $\approx$  130-140 кДа. Відсутність відновлення без нагрівання (умови а) призводили до отримання двох смуг в близькості одна від одної, що вказує на те, що фракція рекомбінантного білка CD134 людини: Fc $\gamma$  людини денатурувала/розкручувалась не повністю. Відсутність відновлення з нагріванням (умови b) призводило до отримання однієї смуги, що вказує на те, що рекомбінантний білок CD134 людини: Fc $\gamma$  людини денатурував/розкручувався повністю. Рекомбінантний білок CD134 людини: Fc $\gamma$  людини при умовах відновлювання (а також із LDS-денатурацією без теплової

денатурації або з нею, умови с і d, відповідно) давав смуги на молекулярній масі  $\approx 110$  кДа (за умови с) і смуги на молекулярній масі  $\approx 60$ -65 кДа (за умови d). Перший результат вказує на неповне відновлення рекомбінантного білка CD134 людини: Fc $\gamma$  людини, а другий результат вказує на повне відновлення/розрив дисульфідних містків, що з'єднують два отриманих з IgG1 фрагментів в кожній молекулі рекомбінантного білка CD134 людини: Fc $\gamma$  людини.

Як показано на фігурі 19-С, антитіла миші до CD134 людини і клону 12Н3, і клону 20Е5 розпізнавали рекомбінантний білок CD134 людини: Fc $\gamma$  людини при невідновлювальних умовах (а також із LDS-денатурацією без теплової денатурації або з нею, умови а і b, відповідно) переважно з молекулярною масою  $\approx 130$  кДа. Навпаки, антитіла миші до CD134 людини клону 12Н3 демонстрували лише слабе зв'язування з рекомбінантним білком CD134 людини: Fc $\gamma$  людини при умовах відновлювання (а також із LDS-денатурацією без теплової денатурації або з нею, умови с і d, відповідно), тоді як антитіла миші до CD134 людини клону 20Е5 демонстрували сильне зв'язування з рекомбінантним білком CD134 людини: Fc $\gamma$  людини при умовах відновлювання (а також із LDS-денатурацією без теплової денатурації або з нею, умови с і d, відповідно).

Зазначені результати демонструють, що антитіла миші до CD134 людини і клону 12Н3, і клону 20Е5 специфічно розпізнавали CD134 людини. Крім того, зазначені результати демонструють, що антитіла миші до CD134 людини клону 12Н3 і клону 20Е5, мабуть, розпізнавали несхожі епітопи CD134 людини, що підтверджувалося відповідним слабким зв'язуванням (клон 12Н3) і сильним зв'язуванням (клон 20Е5) з рекомбінантним білком CD134 людини: Fc $\gamma$  людини при умовах відновлювання (а також із LDS-денатурацією без теплової денатурації або з нею). Дані результати вказують на те, що антитіла миші до CD134 людини і клону 12Н3 розпізнавали епітоп CD134 людини, який не чутливий до денатурації (LDS і впливу тепла), але чутливий до відновлення (тобто, розрив дисульфідного містка(ів) - найімовірніше, пов'язаний з багатими цистеїном (CRD)-доменами - дитіотреїтолу). Дані результати вказують на те, що антитіла миші до CD134 людини і клону 20Е5 розпізнавали епітоп CD134 людини, який не чутливий до денатурації (LDS і впливу тепла) і не чутливий до відновлення (тобто, розрив дисульфідного містка(ів) - найімовірніше, пов'язаний з багатими цистеїном (CRD)-доменами - дитіотреїтолу).

(b). Зв'язування моноклональних антитіл миші до CD134 людини клонів 12Н3 і 20Е5 з повнорозмірною конструкцією CD134 людини і різними процесованими конструкціями CD134 людини, що експресуються лінією клітин 293-F ( картування доменів).

Щоб проаналізувати тонку специфічність моноклональних антитіл миші до CD134 людини клонів 12Н3 і 20Е5 локалізацію епітопу(ів), що розпізнається моноклональними антитілами миші до CD134 людини клонів 12Н3 і 20Е5, визначали шляхом картування доменів. Здатність моноклональних антитіл миші до CD134 людини клонів 12Н3 і 20Е5 до зв'язування з процесованими конструкціями CD134 людини, що експресуються на поверхні (отриманих із HEK) клітин 297-F, визначали за допомогою аналізу FACS.

На підставі літературних даних (Swiss-Prot: P43489.1; Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683; Bodmer et al. Trends Biochem Sci 2002; 27: 19-26; Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330; Патент США 2011/0028688 A1) були ідентифіковані багаті цистеїном домени (CRD) і каркасноподібна структура в позаклітинній області CD134 людини. CRD кодуються CRD1, CRD2, (процесований) CRD3, (процесований) CRD4 (див. фігуру 20). CRD містять топологічно різні типи модулів, іменовані А-модулем і В-модулем (також див. фігуру 20). А-модулі являють собою структури С-форми, а В-модулі являють собою структури S-форми. Типова CRD, як правило, складається із А1-В2-модулів або А2-В1-модулів (або, рідше, іншої пари модулів, таких як А1-В1) з 6 консервативними залишками цистеїну, де цифри позначають номер дисульфідних містків у кожному модулі (також див. фігуру 20). Як показано на фігурі 20, генерували і експресували 5 різних конструкцій CD134 людини: (1) повнорозмірну конструкцію CD134 людини, яка починається з N-кінця CRD1 (тобто, А1-В2-модулі CRD1 охоплюють амінокислоти 29-65), і, отже, позначаються "CRD1", і містить амінокислоти 1-277 (див. SEQ ID №1), (2) конструкцію "CRD2", яка починається з N-кінця CRD2 (тобто, А1-В2-модуль CRD2 охоплює амінокислоти 66-107), і містить амінокислоти 66-277, що пов'язані з амінокислотами сигнального пептиду 1-28 (див. SEQ ID № 30), (3) конструкцію "CRD3", яка починається з N-кінця CRD3 (тобто, А1-В1-модуль CRD3 охоплює амінокислоти 108-146 (згідно Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330) або А1-модуль CRD3 охоплює амінокислоти 108-126 (згідно Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683)) і містить амінокислоти 108-277, що пов'язані з амінокислотами сигнального пептиду 1-28 (див. SEQ ID №31), (4) конструкцію "CRD4", яка складається з N-кінцевого В1-модуля CRD4 або CRD3-субдомену/А1-модуля процесованою CRD4 (тобто, А1-В1-модуль CRD4 охоплює амінокислоти 127-167 (Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), або

поєднання (не показано на фігурі 20) В1-модуля CRD3 з процесованим А1-модулем CRD4 охоплює амінокислоти 127-146 з амінокислотами 147-167, відповідно (Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330)), і що містить амінокислоти 127-277, які пов'язані з амінокислотами сигнального пептиду 1-28 (див. SEQ ID №32), та (5) конструкцію "процесованої (tc) CRD4", яка складається з N-кінцевого процесованого В1-модуля CRD4 або субдомену CRD4 (тобто, А1-модуль процесованої CRD4 охоплює амінокислоти 147-167 (Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330), або В1-модуль субдомену CRD4 (не показано на фігурі 20; Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) охоплює амінокислоти 147-167), і що містить амінокислоти 147-277, що пов'язані з амінокислотами сигнального пептиду 1-28 (див. SEQ ID №33). Зазначені 5 конструкцій CD134 людини генерували за допомогою ПЛР із збіркою із застосуванням ДНК-полімерази Accuprime™ Pfx ("Invitrogen") і праймерів, перерахованих в таблиці нижче:

№ праймера *	Послідовність	SEQ ID №	Напрямок	Ген
362	CTCGGATCCGCCACCATGTGCGTG	51	такий що кодує	лідер CD134
363	AGAATTCTTATTAGATCTTGCCA	55	антисмисловий	кінець CD134
364	ACTGTCACTGGACCCTGCGGTCCC	52	такий що кодує	CRD2
365	GGGACCGCAGGGTCCAGTGACAGT	53	антисмисловий	CRD2
366	ACTGTCACTGGAAGGTGCAGGGCT	54	такий що кодує	CRD3
367	AGCCCTGCACCTTCCAGTGACAGT	56	антисмисловий	CRD3
368	ACTGTCACTGGACCCTGCCCCCT	57	такий що кодує	CRD4
369	AGGGGGGCAGGGTCCAGTGACAGT	58	антисмисловий	CRD4
370	ACTGTCACTGGATGCACCCTGGCT	59	такий що кодує	процесована CRD4
371	AGCCAGGGTGCATCCAGTGACAGT	60	антисмисловий	процесована CRD4

\* номер праймера відповідно з внутрішньою системою кодування "Biosceros";

Якщо коротко, кДНК, така що кодує амінокислоти 1-28 сигнального пептиду, і кДНК, така що кодує амінокислоти 66-277 CD134 людини, ампліфікували із застосуванням пари праймерів 362/365 і 364/363, відповідно, в ПЛР-реакції з повнорозмірним CD134 людини в якості матриці. Потім генерували конструкцію "CRD2" із застосуванням зазначених двох продуктів ПЛР в ПЛР із збіркою та з застосуванням пари праймерів 362/363. кДНК, таку що кодує конструкцію "CRD2", субклонували в плазмиду експресії, що отримана з pcDNA3.1, із застосуванням відповідних сайтів рестрикції. Аналогічно, генерували конструкцію "CRD3" (амінокислоти 1-28 сигнального пептиду, пов'язані з амінокислотами 108-277 CD134 людини), конструкцію "CRD4" (амінокислоти 1-28 сигнального пептиду, пов'язані з амінокислотами 127-277), і конструкцію "процесованої CRD4" (амінокислоти 1-28 сигнального пептиду, пов'язані з амінокислотами 147-277), і субклонували їх у плазмиду експресії, що отримані з pcDNA3.1, із застосуванням відповідних праймерів, що перераховані у таблиці вище. Крім того, в плазмиду експресії, що отримана з pcDNA3.1, також повторно клонували повнорозмірний CD134 людини (SEQ ID №1).

Клітини 293-F FreeStyle™ ("Invitrogen") тимчасово трансфікували 5 згенерованими варіантами CD134 людини із застосуванням системи експресії FreeStyle™ 293 ("Invitrogen"). Через 48-72 години експресію CD134 людини на поверхні трансфікованих клітин оцінювали за допомогою аналізу FACS. Для даної мети трансфіковані клітини відбирали і поміщали при щільності  $1-2 \times 10^6$  клітин/мл в охолоджений льодом PBS/BSA/Na<sub>3</sub>. Клітини інкубували з 20,0 мкг/мл моноклональних антитіл миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5 протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Паралельно, в якості негативного контролю застосовували 20,0 мкг/мл антитіла миші ізотипу IgG1κ ("BD Biosciences"). Після активного промивання в ФСБ/БСА/Na<sub>3</sub> клітини додатково інкубували з розведеними 1:200 PE-кон'югованими антитілами кози до IgG миші (Fcγ-специфічними) ("Jackson ImmunoResearch") протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/Na<sub>3</sub> клітини фіксували в 2 % формальдегіді в ФСБ/БСА/Na<sub>3</sub> протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Зв'язування антитіл вимірювали за допомогою проточної цитометрії (FACSCalibur; "BD Biosciences").

Як показано на фігурі 21, антитіла миші до CD134 людини і клону 12H3, і клону 20E5 розпізнавали повнорозмірний CD134 людини (позначений як конструкція "CRD1") на трансфікованих клітинах 293-F, проте антитіла миші до CD134 людини і клону 12H3, і клону 20E5 не демонстрували зв'язування на поверхні клітин 293-F, трансфікованих контрольним

антитілом. Більш того, антитіла миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5 розпізнавали процесовані варіанти CD134 людини, в яких не було CRD1 і CRD1-CRD2 (позначені як конструкція "CRD2" і конструкція "CRD3", відповідно) на трансфікованих клітинах 293-F. Навпаки, зв'язування антитіл миші до CD134 людини клону 12H3 з процесованим варіантом CD134 людини, в якому не було CRD1-CRD2-процесованого A1-модуля CRD3 (позначений як конструкція "CRD4"), було дуже слабким, а зв'язування антитіл миші до CD134 людини клону 12H3 з процесованим варіантом CD134 людини, в якому не було CRD1-CRD2-процесованого A1-модуля CRD3/A1-модуля субдомену CRD4 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), або, як альтернатива, A1-B1-модуля CRD1-CRD2-CRD3 (згідно з визначенням Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330; позначений як конструкція "CRD4"), взагалі було відсутнє, тоді як антитіла миші до CD134 людини клону 20E5 демонстрували сильне зв'язування з процесованим варіантом CD134 людини, в якому не було CRD1-CRD2-процесованого A1-модуля CRD3 (позначений як конструкція "CRD4") і з процесованим варіантом CD134 людини, в якому не було CRD1-CRD2-процесованого A1-модуля CRD3- A1-модуля субдомену CRD4 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), або, як альтернатива, A1-B1-модуля CRD1-CRD2-CRD3 (згідно з визначенням Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330; позначено як конструкція "CRD4").

Зазначені результати демонструють, що антитіла миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5 специфічно розпізнавали CD134 людини (порівняння трансфекції повнорозмірного CD134 людини і трансфекції контролю). Крім того, зазначені результати демонструють, що антитіла миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5 мабуть розпізнають несхожі епітопи CD134 людини, що підтверджувалося відповідним слабким зв'язуванням (при застосуванні клону 12H3) і сильним зв'язуванням (при застосуванні клону 20E5) з процесованим варіантом CD134 людини, у якого не було CRD1-CRD2-процесованого A1-модуля CRD3 (позначений як конструкція "CRD4"), і з процесованим варіантом CD134 людини, у якого не було CRD1-CRD2-процесованого A1-модуля CRD3-A1-модуля субдомену CRD4 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), або, як альтернатива, A1-B1-модуля CRD1-CRD2-CRD3 (згідно з визначенням Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330; позначений як конструкція "CRD4"). Зазначені результати демонструють, що антитіла миші до CD134 людини клону 12H3, напевно не розпізнавали епітоп CD134 людини в CRD1 і CRD2, а антитіла миші до CD134 людини клону 20E5, напевно, не розпізнавали епітоп CD134 людини в CRD1, CRD2 і в A1-модулі процесованої CRD3-A1-модулі субдомену CRD4 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) або, як альтернатива, в A1-B1-модулі CRD1-CRD2-CRD3 (згідно з визначенням Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330). Зазначені результати демонструють, що антитіла миші до CD134 людини клону 12H3, мабуть, розпізнавали лінійний або нелінійний/конформаційний епітоп CD134 людини в A1-модулі процесованої CRD3 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) з послідовністю амінокислот 108-126 (тобто, 19-мірний пептид RCRAFTQPLDSYKPGVDCA; див. SEQ ID №34) на позаклітинній частині CD134 людини, або з послідовністю амінокислот 108-126 (тобто, 19-мірний пептид RCRAFTQPLDSYKPGVDCA; див. SEQ ID №34), що утворює критичну ділянку для зв'язування з нелінійним/конформаційним епітопом в A1-модулі процесованою CRD3/A1-B1-модулі CRD4 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), і, можливо, в каркасоподібній структурі з послідовністю амінокислот 108-214 (див. SEQ ID №35) на позаклітинній частині CD134 людини. Зазначені результати демонструють, що антитіла миші до CD134 людини клону 20E5, напевно, розпізнавали лінійний або нелінійний/конформаданійний епітоп в A1-модулі процесованою CRD4 (згідно з визначенням Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330), і, можливо, в каркасоподібній структурі з послідовністю амінокислот 147-214 (див. SEQ ID №36) на позаклітинній частині CD134 людини.

За допомогою кристалографії Compaan et al. (Structure 2006; 14: 1321-1330) нещодавно показали важливу роль CRD1, CRD2 (особливо петлі A1 і слідуючих відразу за нею залишків) і CRD3 (головним чином, петлі A1) на молекулі CD134 людини у взаємодії ліганду OX40 (CD252)/CD134 (=OX40). Дане відкриття добре узгоджується з нашими результатами щодо того (1, див. вище), що антитіла миші до CD134 людини клону 20E5, напевно, не розпізнавали епітоп CD134 людини в CRD1, CRD2 і A1-модулі процесованої CRD3-A1-модулі субдомену CRD4 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), або як альтернатива, в A1-B1-модулі CRD1-CRD2-CRD3 (згідно з визначенням Compaan et al. Structure 2006; 14: 1321-1330; позначено як конструкція "CRD4") на позаклітинній частині CD134 людини, і (2, див. вище) що антитіла миші до CD134 людини клону 20E5 одночасно зв'язувалися з OX40L на поверхні РНА-стимульованих Т-лімфоцитах людини, що експресують CD134 людини. Це вказує на те, що антитіла миші до CD134 людини клону 20E5 розпізнавали епітоп на CD134 людини,

який не відігравав важливої ролі у взаємодії CD134 людини з OX40L людини. Крім того, наші результати стосовно того (1, див. вище), що антитіла миші до CD134 людини клону 12H3, мабуть, розпізнавали лінійний або нелінійний/конформаційний епітоп CD134 людини в A1-модулі процесованої CRD3 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) з послідовністю амінокислот 108-126 (тобто, 19-мірний пептид RCRAFTQPLDSYKPGVDCA; див. SEQ ID №34) на позаклітинній частині CD134 людини, або з послідовністю амінокислот 108-126 (тобто, 19-мірний пептид RCRAFTQPLDSYKPGVDCA; див. SEQ ID №34), що утворює критичну ділянку для зв'язування з нелінійним/конформаційним епітопом в A1-модулі процесованої CRD3/ A1-B1-модулі CRD4 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), і, можливо, в каркасоподібній структурі з послідовністю амінокислот 108-214 (див. SEQ ID №35) на позаклітинній частині CD134 людини, і що (2, див. вище) антитіла миші до CD134 людини клону 12H3 одночасно зв'язувалися з OX40L на поверхні PHA-стимульованих Т-лімфоцитів людини, що експресують CD134 людини, даний факт підтверджує ідею про те, що епітоп (описаний вище) на CD134 людини, який розпізнавався антитілами миші до CD134 людини клону 12H3, не відігравав важливої ролі у взаємодії CD134 людини з OX40L людини.

(с). Картування епітопів (1) моноклональних антитіл миші до CD134 людини клону 12H3 за допомогою ELISA із застосуванням пептиду, отриманого з CD134 людини.

Щоб більш детально проаналізувати тонку специфічність моноклональних антитіл миші до CD134 людини клону 12H3 шляхом картування епітопів визначали локалізацію епітопу, який розпізнавався антитілами миші до CD134 людини клону 12H3. Здатність антитіл миші до CD134 людини клону 12H3 зв'язуватися з пептидом, що отриманий з CD134 людини, якій відповідає послідовність амінокислот A1-модуля процесованої CRD3-A1-модуля субдомену CRD4 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), визначали за допомогою ELISA.

У планшети на 96 лунок з плоским дном ("Corning") наносили по 10 нг/лунку пептиду, отриманого з CD134 людини (синтезованого Pepscan Presto, Лелистад, Нідерланди), який відповідає послідовності амінокислот A1-модуля процесованої CRD3-A1-модуля субдомену CRD4 (див. SEQ ID №38), або 10 нг/лунку контрольного пептиду, отриманого з фібринектину людини (синтезованого Pepscan Presto, Лелистад, Нідерланди), який відповідає послідовності амінокислот позаклітинного структурного домену III типу (див. SEQ ID №37) в ФСБ і залишали на одну ніч при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/0,05 % Tween 20 реакцію в планшетах блокували в ФСБ/0,05 % Tween 20/ 1 % фракції V БСА ("Roche") протягом 1 години при КТ. Потім планшети інкубували з 0, 0,00005-50,0 (етапи 10-кратних розведень в блокуючому буфері) моноклональних антитіл миші до CD134 людини клону 12H3 або контрольних антитіл миші ізотипу IgG1к ("BD Biosciences") протягом 1 години при КТ. Після активного промивання в ФСБ/0,05 % Tween 20 зв'язування антитіл визначали за допомогою інкубації з розведеними 1:5000 антимишачими Fcy-специфічними антитілами кози, кон'югованими з пероксидазою хрому ("Jackson ImmunoResearch") протягом 1 години при КТ, а після цього - з готовим до вживання розчином субстрату TMB ("Invitrogen") для колориметричної детекції. Після додавання 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> оптичну щільність вимірювали на довжині хвилі 450 нм (еталонна довжина хвилі 655 нм) за допомогою мікропланшетного рідера ("BioRad").

Як показано на фігурі 23-A (n=1), моноклональні антитіла миші до CD134 людини клону 12H3 дозозалежно і специфічно зв'язувалися з пептидом, що отриманий з CD134 людини, а контрольні антитіла миші ізотипу IgG1к не демонстрували зв'язування з пептидом, що отриманий з CD134 людини. Ані моноклональні антитіла миші до CD134 людини клону 12H3, ані контрольні антитіла миші ізотипу IgG1к не демонстрували зв'язування з пептидом, що отриманий з фібринектину людини.

Зазначені результати демонструють, що антитіла миші до CD134 людини клону 12H3 специфічно розпізнавали епітоп на CD134 людини (порівняння пептиду, отриманого з CD134 людини, і контрольного пептиду, отриманого з CD134 людини). Крім того, зазначені результати демонструють, що антитіла миші до CD134 людини клону 12H3, мабуть, розпізнавали лінійний або нелінійний/конформаційний епітоп в A1-модулі процесованої CRD3-A1-модулі субдомену CRD4 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) з послідовністю амінокислот 108-146 (тобто, 39-мірний пептид RCRAFTQPLDSYKPGVDCAPCPGHFSPGDNQACKPWTN; див. SEQ ID №38) на позаклітинній частині CD134 людини.

(d). Картування епітопів (2) моноклональних антитіл миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5 за допомогою технології картування епітопів CLIPS за процедурою "Pepscan".

Технологію картування епітопів CLIPS за процедурою "Pepscan" (Лелістад, Нідерланди) можна застосовувати для визначення епітопів, які розпізнаються антитілами миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5. Технологія CLIPS дозволяє визначати лінійні, конформаційні,

переривчасті і складові епітопи, що включають димерні і мультимірні білкові комплекси. Для даної мети в якості білка-мішені застосовують лінійну послідовність амінокислот CD134 людини = OX40 (SEQ ID №1).

5 Приклад 9. Опис доменів і епітопів CD134 людини, які розпізнаються химерними моноклональними антитілами до CD134 людини, що містять IgG4/каппа та/або IgG1/каппа, клонів 12H3 і 20E5.

(а). Зв'язування химерних х моноклональних х антитіл до CD134 людини, що містить IgG4/каппа та/або IgG1/каппа, клонів 12H3 і 20E5 з повнорозмірною конструкцією CD134 людини і різними процесованими конструкціями CD134 людини, які експресуються лінією клітин 293-F (картування доменів).

10 Щоб проаналізувати тонку специфічність химерних моноклональних антитіл до CD134 людини, що містять IgG4к та/або IgG1к, клонів 12H3 і 20E5, локалізацію епітопу(ів), що розпізнається моноклональними химерними антитілами до CD134 людини, що містять IgG4к та/або IgG1к, клонів 12H3 і 20E5 визначали шляхом картування доменів. Здатність специфічних химерних моноклональних антитіл до CD134 людини, що містять IgG4к та/або IgG1к, клонів 12H3 і 20E5 до зв'язування з процесованими конструкціями CD134 людини (див. Приклад 8(b), що наведено вище), експресуємих на поверхні (отриманих з НЕК) клітин 297-F, визначали за допомогою аналізу FACS.

15 Клітини 293-F FreeStyle™ ("Invitrogen") тимчасово трансфікували 5 згенерованими варіантами CD134 людини із застосуванням системи експресії FreeStyle™ 293 ("Invitrogen"). Через 48-72 години експресію CD134 людини на поверхні трансфікованих клітин оцінювали за допомогою аналізу FACS. Для даної мети трансфіковані клітини відбирали і поміщали при щільності  $1-2 \times 10^6$  клітин/мл в охолоджений льодом PBS/BSA/NaN<sub>3</sub>. Клітини інкубували з додаванням або без додавання 20,0 мкг/мл химерних моноклональних антитіл до CD134 людини, що містять IgG4к та/або IgG1к людини, клонів 12H3 і 20E5 протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub>, клітини додатково інкубували з розведеними 1:200 РЕ-кон'югованими антитілами кози до IgG миші (Fcγ-специфічними) ("Jackson ImmunoResearch") протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> клітини фіксували в 2 % формальдегіді в ФСБ/БСА/NaN<sub>3</sub> протягом 30 хвилин при температурі 4° С. Зв'язування антитіл вимірювали за допомогою проточної цитометрії (FACSCalibur; "BD Biosciences").

20 Як показано на фігурі 22, і моноклональні химерні антитіла до CD134 людини, що містять IgG4к і IgG1к, клону 12H3, і химерні антитіла до CD134 людини, що містять IgG4к, клону 20E5 демонстрували зв'язування з різними процесованими конструкціями CD134 людини на поверхні трансфікованих клітин, яке за властивістю було подібне зі зв'язуванням відповідних їм вихідних антитіл миші до CD134 людини клонів 12H3 і 20E5 (див. Приклад 8(b), що наведено вище; для порівняння, див. фігуру 22 і фігуру 21).

35 (b). Картування епітопів химерних моноклональних антитіл, що містять IgG4к, до CD134 людини клону 12H3 за допомогою ELISA із застосуванням пептиду, отриманого з CD134 людини.

40 Щоб більш детально проаналізувати тонку специфічність химерних моноклональних антитіл, що містять IgG4к людини, до CD134 людини клону 12H3 шляхом картування епітопів визначали локалізацію епітопу, розпізнаваного химерними антитілами, що містять IgG4к людини. Здатність химерних моноклональних антитіл, що містять IgG4к людини, до CD134 людини клону 12H3 зв'язуватися з пептидом, отриманим з CD134 людини, якому відповідає послідовність амінокислот A1-модуля процесованої CRD3-A1-модуля субдомену CRD4 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683), визначали за допомогою ELISA.

45 У планшети на 96 лунок з плоским дном ("Corning") наносили по 10 нг/лунку пептиду, отриманого з CD134 людини (синтезованого PepscanPresto, Лелистад, Нідерланди), який відповідає послідовності амінокислот A1-модуля процесованої CRD3-A1-модуля субдомену CRD4 (див. SEQ ID №38), або по 10 нг/лунку контрольного пептиду, отриманого з фібринонектину людини (синтезованого Pepscan Presto, Лелистад, Нідерланди), який відповідає послідовності амінокислот позаклітинному структурному домену III типу (див. SEQ ID №37) в ФСБ і залишали на одну ніч при температурі 4° С. Після активного промивання в ФСБ/0,05 % Tween 20 реакцію в планшетах блокували в ФСБ/0,05 % Tween 20/1 % фракції V БСА ("Roche") протягом 1 години при КТ. Потім планшети інкубували з 0, 0,00005-50,0 мкг/мл (етапи 10-кратних розведень в блокуючому буфері) химерних моноклональних антитіл, що містять IgG4к людини, до CD134 людини клону 12H3 або контрольних антитіл з IgG4к людини до CD40 людини ("Bioscult") протягом 1 години при КТ. Після активного промивання в ФСБ/0,05 % Tween 55 20 зв'язування антитіл визначали за допомогою інкубації з розведеними 1:5000 антимишачими 60

Фсγ-специфічними антитілами кози, кон'югованими з пероксидазою хрому ("Jackson ImmunoResearch") протягом 1 години при КТ, а після цього - з готовим до вживання розчином субстрату ТМВ ("Invitrogen") для колориметричної детекції. Після додавання 1 М Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> вимірювали оптичну щільність на довжині хвилі 450 нм (еталонна довжина хвилі 655 нм) за допомогою мікропланшетного рідера ("BioRad").

Як показано на фігурі 23-В (n=1), химерні моноклональні антитіла, що містять IgG4к людини, до CD134 людини клону 12H3 дозозалежно і специфічно зв'язувалися з пептидом, отриманим з CD134 людини, а контрольні антитіла людини ізо типу IgG4к до CD40 людини не демонстрували зв'язування з пептидом, отриманим з CD134 людини. Ні моноклональні антитіла, що містять IgG4к людини, до CD134 людини клону 12H3, ні контрольні антитіла людини ізо типу IgG<sub>а</sub>к до CD40 людини не демонстрували зв'язування з контрольним пептидом, отриманим з фібронектину людини.

Зазначені результати демонструють, що химерні моноклональні антитіла, що містять IgG4к людини, до CD134 людини клону 12H3 специфічно розпізнавали епітоп на CD134 людини (порівняння пептиду, отриманого з CD134 людини, і контрольного пептиду, отриманого з фібронектина людини). Крім того, зазначені результати демонструють, що химерні моноклональні антитіла, що містять IgG4к людини, до CD134 людини клону 12H3, мабуть, розпізнавали лінійний або нелінійний/конформаційний епітоп в А1-модулі процесованої CRD3-А1-модулі субдомену CRD4 (згідно з визначенням Latza et al. Eur J Immunol 1994; 24: 677-683) з послідовністю амінокислот 108-146 (тобто, 39-мірний пептид RCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTN; див. SEQ ID №38) на позаклітинній частині CD134 людини.

Перелік послідовностей, що додається, являється частиною даного опису.

В SEQ ID №:1, яка являє собою послідовність амінокислот CD134 людини (GenBank ref CAB96543.1; ак 1-277), окремий пептид складають амінокислоти (ак 1-28)), і трансмембранну область в ак 215-235.

SEQ ID №:61, яка утворює амінокислоти N-кінця SEQ ID №:5, також представляє інтерес. Це легкий ланцюг 20E5, який еквівалентний SEQ ID №:3, і який являє собою 11 N-кінцевих амінокислот важкого ланцюга 20E5.

SEQ ID №37 (TYSSPEDGIHELFPAPDGEEDTAELQGCG), послідовність амінокислот з пептиду, отриманого з фібронектина людини, відповідає послідовності і амінокислот позаклітинного структурного домену III типу (ED1; Peters et al. Am Rev Resp Dis 1988; 138: 167-71).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> БІОСЕРОКС ПРОДАКТС Б.В.  
 <120> АНТИ-CD134 (OX40) АНТИТІЛА ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ  
 <130> BIOBF/P51941PC  
 <150> GB 1116092.6  
 <151> 2011-09-16  
 <160> 61  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 277  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> СИГНАЛ  
 <222> (1)...(28)  
 <220>  
 <221> ТРАНСМЕМБРАННИЙ ДОМЕН  
 <222> (215)...(235)  
 <400> 1  
 Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val  
 20 25 30  
 Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro  
 35 40 45  
 Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys  
 50 55 60  
 Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro  
 65 70 75 80  
 Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys  
 85 90 95  
 Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly  
 100 105 110  
 Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys  
 115 120 125  
 Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp  
 130 135 140  
 Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn  
 145 150 155 160

Сторінка 1

Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro  
165 170 175  
Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr  
180 185 190  
Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu  
195 200 205  
Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val  
210 215 220  
Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu  
225 230 235  
Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly  
245 250 255  
Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser  
260 265 270  
Thr Leu Ala Lys Ile  
275

<210> 2  
<211> 834  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Послідовність ДНК для CD134 людини, що оптимізована для клітин комах Sf9

<400> 2

atgtgcgtgg gcgctcgtcg tctgggtcgt ggtccctgcg ctgctctgct gctgctgggt	60
ctgggcctgt ccaactgtcac tggactccac tgcgtgggag acacctaccc ctccaacgac	120
cgttgctgcc acgaatgcag gcctggcaac ggcattggtgt cccgttgctc ccgttcccag	180
aacaccgtgt gccgtccctg cgggtcccggt ttctacaacg acgtgggtgc ctccaagccc	240
tgcaagcctt gcaattgggtg taacctccgc tccggttccg agcgcaagca gctgtgcacc	300
gctaccacag acactgtctg taggtgcagg gctggcacc agcccctgga ctctacaag	360
cccgggtgtc actgcgtcc ctgccccct ggtcacttct ctcccgccga caaccaggct	420
tgcaaacctt ggaccaactg caccctgggt ggcaagcaca cctgcagcc cgcttccaac	480
tcctccgacg ctatctgcga ggaccgtgac cccctgcta ctcaacctca ggagactcag	540
gggtcccccg ctggtcccat caccgtgcag cccaccgagg cttggccccg tacctccaa	600
ggacctagca ctaggcctgt ggaggtgccc ggtgggtcgt ctgtggctgc taccctgggc	660
ctgggtctgg tgctgggcct gctgggtccc ctggctatcc tgctggctct gtacctctg	720
cgctcgtgacc agcgtctgcc ccccgacgct cacaagcccc ctgggtgggtg ttccttcctg	780

accccatcc aggaggagca ggctgacgct cactccaccc tggccaagat ctaa

834

<210> 3  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Послідовність амінокислот на N-кінці важкого ланцюга клону 20E5

<400> 3

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu  
1 5 10

<210> 4  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Послідовність амінокислот варіабельної області важкого ланцюга клону 2

<400> 4

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe  
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 5  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Послідовність амінокислот варіабельної області легкого ланцюга клону 20E5

<400> 5

Сторінка 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
 100 105

<210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> послідовність амінокислот CDR1 важкого ланцюга клону 20E5  
 <400> 6

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His  
 1 5 10

<210> 7  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> послідовність амінокислот CDR2 важкого ланцюга клону 20E5  
 <400> 7

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

<210> 8  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> послідовність амінокислот CDR3 важкого ланцюга клону 20E5  
 <400> 8

сторінка 4

Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr  
1 5 10

<210> 9  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність амінокислот CDR1 легкого ланцюга клону 20E5  
<400> 9

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn  
1 5 10

<210> 10  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність амінокислот CDR2 легкого ланцюга клону 20E5  
<400> 10

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser  
1 5

<210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність амінокислот CDR3 легкого ланцюга клону 20E5  
<400> 11

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr  
1 5

<210> 12  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> послідовність амінокислот варіабельної області важкого ланцюга клону 12H3  
<400> 12

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr  
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe  
50 55 60

Сторінка 5

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val Trp Gly  
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Pro  
115 120

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> послідовність амінокислот варіабельної області легкого ланцюга клону 12Н3

<400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Leu Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> штучна послідовність

<220>

<223> послідовність амінокислот CDR1 важкого ланцюга клону 12Н3

<400> 14

Gly Tyr Thr Phe Lys Asp Tyr Thr Met His  
1 5 10

Сторінка 6

<210> 15  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Послідовність амінокислот CDR2 важкого ланцюга клону 12Н3  
 <400> 15

Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn Gln Asn Phe Lys  
 1 5 10 15

Asp

<210> 16  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Послідовність амінокислот CDR3 важкого ланцюга клону 12Н3  
 <400> 16

Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp Val  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Послідовність амінокислот CDR1 легкого ланцюга клону 12Н3  
 <400> 17

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ala Ala Val Ala  
 1 5 10

<210> 18  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Послідовність амінокислот CDR2 легкого ланцюга клону 12Н3  
 <400> 18

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr  
 1 5

<210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Послідовність оптимізованої CDR3 легкого ланцюга клону 12Н3

Сторінка 7

<400> 19

Gln Gln Tyr Ile Asn Tyr Pro Leu Thr  
1 5

<210> 20

<211> 1398

<212> PRT

<213> Штучна послідовність<220>

<223> Послідовність оптимізованої для СНО КДНК, що кодує химерний ланцюг IgG4 людини клону 20E5

<400> 20

atggagtgga gcgagtggt tatgttcctg ctgagcgtga ccgctggcgt gcaactcagag	60
gtgcagctgc agcagtcagg ccccgagctg gtcaagcctg gcgctagcgt gaagatgagc	120
tgtaaagcta gcggtacac ctccactagc tacgtgatgc actgggtcaa gcagaagccc	180
ggccaggggc tggagtggat cggctatatt aaccctata acgacggcac taagtataac	240
gagaagttta agggcaaggc taccctgact agcgataagt ctagctctac cgcctatatg	300
gaactgtcta gtctgactag tgaagatagc gccgtctact actgcgctaa ctactacggc	360
tctagcctgt ctatggacta ctggggccag ggcactagcg tgaccgtgtc tagcgctagc	420
actaagggcc ctagecgtgt cccctgggcc ccctgctcta gatctactag cgagtctacc	480
gccgctctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt cagctggaat	540
agcggcgctc tgactagcgg cgtgcacacc ttccctgccg tgctgcagtc tagcggcctg	600
tatagtctgt ctagecgtgt caccgtgcct agttctagcc tgggcactaa gacctacacc	660
tgtaacgtgg accacaagcc ctctaact aagggtggaca agcgggtgga atctaagtac	720
ggccctccct gccccctg ccctgcccct gaatttctg gcggacctag tgtgttcctg	780
ttcccaccta agcctaagga caccctgatg atctctagaa cccccgaagt gacctgcgtg	840
gtgggtggacg tgtcacagga agatcccag gtccagttaa attggtacgt ggacggcgtg	900
gaagtgcaca acgctaagac taagcctaga gaggaacagt ttaactctac ctatagggtc	960
gtcagcgtgc tgaccgtgct gcaccaggac tggctgaacg gcaaagagta taagtgtaaa	1020
gtgtctaaca agggcctgcc tagctctatc gaaaagacta tctctaaggc taagggccag	1080
cctagagaac ctcaggtcta caccctgccc cctagtcagg aagagatgac taagaatcag	1140
gtgtcactga cctgtctggt caagggttc taccctagcg atatcgccgt cgagtgggag	1200
tctaacggcc agcccagaa caactataag actaccccc ctgtgctgga tagcgacggc	1260
agcttcttcc tgtactcacg gctgaccgtg gataagtcta ggtggcagga aggaacgtc	1320
tttagctgta gcgtgatgca cgaggccctg cacaatcact aactcagaa gtactgagc	1380
ctgagcctgg gcaagtga	1398

<210> 21

<211> 702

<212> PRT

Сторінка 8

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність оптимізованої для СНО КДНК, що кодує химерний ланцюг каппа людини клону 20Е5

<400> 21

```
atggagtgga gcgagtggt tatgttcctg ctgagcgtga ccgctggcgt gcaactcagat      60
attcagatga ctcagactac ctctagcctg agcgcctagcc tgggcgatag agtgactatt      120
agctgtagag ctatgcagga tatctctaac tacctgaact ggtatcagca gaaacccgac      180
ggcaccgtga agctgctgat ctactacacc tctagactgc actcaggcgt gccctctagg      240
tttagcggta gcggtagtgg caccgactat agcctgacta tctctaacct ggaacaggaa      300
gatatcgcta cctacttctg tcagcagggc aacaccctgc cctggacctt cggcggaggc      360
actaagctgg aaatcaagcg gaccgtggcc gctccctcag tgtttatctt cccacctagc      420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgctagc gtcgtgtgcc tgcgaacaa cttctaccct      480
agagaagcta aggtgcagtg gaaagtggat aacgccctgc agtcaggcaa ctctcaggaa      540
tcagtcaccg agcaggactc taaggatagc acctatagcc tgtctagcac cctgaccctg      600
tctaaggccg actacgagaa gcacaaggct tacgcctgcg aagtgactca ccagggactg      660
tctagccccg tgactaagtc cttaataga ggcgagtgc ga                          702
```

<210> 22

<211> 1407

<212> PRT

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Послідовність оптимізованої для СНО КДНК, що кодує химерний ланцюг IgG1 людини клону 20Е5

<400> 22

```
atggagtggt caggcgtggt catgttcctg ctgagcgtga ccgctggcgt gcaactcagag      60
gtgcagctgc agcagtcagg ccccgagctg gtcaagcctg gcgctagcgt gaagatgagc      120
tgtaaagcta gcggctacac cttcactagc tacgtgatgc actgggtcaa gcagaagccc      180
ggtcagggcc tggagtggat cggctatatt aaccctata acgacggcac taagtataac      240
gagaagttaa agggtaaagc taccctgact agcgataagt ctagtcttac cgcctatatg      300
gaactgtcta gtctgactag tgaagatagc gccgtctact actgcgctaa ctactacggc      360
tctagcctgt ctatggacta ctggggtcag ggcactagcg tgaccgtgtc tagcgctagc      420
actaagggcc ctagcgtggt cccctggcc cctagctcta agtctactag cggcggcacc      480
gccgctctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgagc ccgtgaccgt cagctggaat      540
agcggcgctc tgactagcgg agtgcacacc ttccccgccc tgctgcagtc tagcggcctg      600
tatagtctgt ctacgctggt caccgtgcct agttctagcc tgggcactca gacctatc      660
```

Сторінка 9

tgtaacgtga accacaagcc ctctaact aaggtggaca agaaggtgga acctaagtcc	720
tgcgataaga ctcacacctg tccccctgc cctgccccctg agctgctggg aggacctagt	780
gtgttcctgt tcccaccta gacctaggac accctgatga tctctagaac cccgaagtg	840
acctgcgtgg tggggacgt cagtcacgag gacctgaag tgaagttaa ttggtacgtg	900
gacggcgtgg aagtgcacaa cgctaagact aagcctagag aggaacagta taactctacc	960
tatagggtcg tcagcgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg taaagagtat	1020
aagtgtaaag tgtctaaca ggcctgcca gccctatcg aaaagactat ctctaaggct	1080
aagggtcagc ctagggaacc tcaggtctac accctgcccc ctagtaggga cgagctgact	1140
aagaatcagg tcagcctgac ttgtctggc aagggtctt accctagcga tatcgccgtc	1200
gagtgggagt ctaacggtca gcccgagaac aactataaga ctacccccctg ttgtctggat	1260
agcgacggta gcttcttct gtactctaaa ctgaccgtgg ataagtctag gtggcagcag	1320
ggtaacgtgt tcagctgtg cgtgatgcac gaggccctgc acaatcacta cactcagaag	1380
tcactgagcc tgagccccgg taagtga	1407

<210> 23  
 <211> 1404  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність

<220>  
 <223> Послідовність оптимізованої для СНО кДНК, що кодує химерний ланцюг IgG<sup>4</sup> людини клону 12Н3

<400> 23	
atggagtggt ctggtgtctt tatgttcctg ctgtccgtga ccgcggtgt ccacagcgag	60
gtgcagctgc agcagtcagg ccctgagctg gtgaaacctg gcgcctccgt gaagatctcc	120
tgcaagacct ccggctacac cttcaaggac tacacaatgc actgggtgaa acagtccac	180
ggcaagtcct tggagtggat cggcggaatc taccccaaca acggcggctc cacctacaac	240
cagaacttca aggacaaggc caccctgacc gtggacaagt cctcctccac cgcctatatg	300
gaatttcggt ccctgacctc cgaggactcc gccgtgtact actgcgccg gatgggctac	360
cacggcccc acctggattt cgacgtgtgg ggcgtggca ccaccgtgac cgtgtctcca	420
gctagacca agggccctc cgtgttcct ctggccctt gctcccggc cacctccgag	480
tctaccgcc ctctgggtg cctggtgaaa gactacttcc ccgagcccg gacagtgtcc	540
tggaactctg gcgcccgtg cagcggtgtg cacaccttcc ctgccgtgt gcagctctcc	600
ggcctgtact ccctgtcctc cgtggtgaca gtgcctcct ccagcctggg caccaagacc	660
tacacctgta acgtggacca caagccctcc aacaccaagg tggacaagcg ggtggaatct	720
aagtacggcc ctccctgccc accttgccct gccctgaat ttctgggcgg accttccgtg	780
ttcctgttcc ccccaaagcc caaggacacc ctgatgatct cccggacccc cgaagtgacc	840
tgctggtgtg tggacgtgtc ccaagaagat cccgaggtcc agttcaattg gtacgtggac	900

Сторінка 10

```

ggcgtggaag tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagttaa ctccacctac 960
cgggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa agagtacaag 1020
tgcaaggctt ccaacaaggg cctgcccagc tctatcgaaa agacaatctc caaggccaag 1080
ggccagcccc gcgagcccca ggtgtacacc ctgcctccca gccagaaga gatgaccaag 1140
aaccagggtg ccctgacttg tctggtgaaa ggcttctacc cctccgatat cgccgtcgag 1200
tgggagtcca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca cccccctgt gctggactcc 1260
gacggctcct tcttctgtga ctctcggctg acagtggata agtcccgggt gcaagaaggc 1320
aacgtcttct cctgtccgtg gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagtcc 1380
ctgtccctga gcctgggcaa gtag 1404

```

<210> 24  
 <211> 702  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність<220>  
 <223> Послідовність оптимізованої для СНО кДНК, що кодує химерний ланцюг каппа людини клону 12Н3

```

<400> 24
atggagtggc ccggtgtctt tatgttcctg ctgtccgtga ccgctggcgt gactccgat 60
atcgtgatga ccagtcacca caagtttatg tccacctccc tgggcgacag agtctctatt 120
acctgcaagg cctcccagga cgtgggcgct gccgtggcct ggtatcagca gaagcccggc 180
cagtcaccca agctgtgat ctactgggcc tccaccagac acaccggcgt gccgcagaca 240
ttcaccggcg gaggtcttgg caccgacttc accctgacaa tctccaacgt gcagtccgag 300
gacctgaccg actacttctg ccagcagtat atcaactacc cctgacctt cggcggaggc 360
accaagctgg aaatcaagcg gaccgtggcc gctccctccg tgtttatctt cccaccttcc 420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtctgcc tgctgaacaa cttctacccc 480
cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac aacgccctgc agtccggcaa ctcccaagaa 540
tccgtgaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgcctccac cctgacctg 600
tccaaggccg actacgagaa gcacaagggtg tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg 660
tccagccccg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgtc aa 702

```

<210> 25  
 <211> 465  
 <212> PRT  
 <213> Штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Послідовність амінокислот химерного ланцюга людини IgG4 клону 20Е5

```

<400> 25
Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1          5          10          15
Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
                               Сторінка 11

```

20										25										30										
Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe															
		35					40					45																		
Thr	Ser	Tyr	Val	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu															
	50					55					60																			
Glu	Trp	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn															
	65				70					75					80															
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser															
				85					90					95																
Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val															
			100					105					110																	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Met	Asp	Tyr	Trp															
		115					120					125																		
Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro															
	130					135					140																			
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr															
	145				150					155					160															
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr															
				165					170					175																
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro															
			180					185					190																	
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr															
		195					200					205																		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp															
	210					215					220																			
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr															
	225				230					235				240																
Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro															
				245					250				255																	
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser															
			260					265					270																	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp															
		275					280					285																		
Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn															
	290					295					300																			

Сторінка 12

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val  
305 310 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys  
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys  
420 425 430

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
450 455 460

Lys  
465

<210> 26  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Послідовність амінокислот химерного ланцюга каппа людини клону 20E5

<400> 26

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala  
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile  
35 40 45

Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys  
сторінка 13

50 55 60  
 Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg  
 65 70 75 80  
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn  
 85 90 95  
 Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr  
 100 105 110  
 Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
 115 120 125  
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140  
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 145 150 155 160  
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175  
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 180 185 190  
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 195 200 205  
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 210 215 220  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230  
 <210> 27  
 <211> 468  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Послідовність амінокислот химерного ланцюга IgG1 людини клону 20E5  
 <400> 27  
 Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
 20 25 30  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

сторінка 14

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn  
 65 70 75 80  
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ser Met Asp Tyr Trp  
 115 120 125  
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro  
 130 135 140  
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr  
 145 150 155 160  
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
 165 170 175  
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 180 185 190  
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr  
 195 200 205  
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn  
 210 215 220  
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser  
 225 230 235 240  
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu  
 245 250 255  
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 260 265 270  
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 275 280 285  
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 290 295 300  
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr  
 305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn  
 325 330 335  
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro  
 340 345 350  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 355 360 365  
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val  
 370 375 380  
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val  
 385 390 395 400  
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 405 410 415  
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 420 425 430  
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 435 440 445  
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 450 455 460  
 Ser Pro Gly Lys  
 465  
 <210> 28  
 <211> 467  
 <212> PRT  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> Послідовність амінокислот химерного ланцюга IgG4 людини клону 12H3  
 <400> 28  
 Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys  
 20 25 30  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45  
 Lys Asp Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Asn  
 65 70 75 80

Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser  
 85 90 95  
 Thr Ala Tyr Met Glu Phe Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Met Gly Tyr His Gly Pro His Leu Asp Phe Asp  
 115 120 125  
 Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Pro Ala Ser Thr Lys  
 130 135 140  
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 165 170 175  
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 180 185 190  
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 195 200 205  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn  
 210 215 220  
 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser  
 225 230 235 240  
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly  
 245 250 255  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 260 265 270  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln  
 275 280 285  
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 290 295 300  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr  
 305 310 315 320  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 325 330 335  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile  
 340 345 350  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 17

355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val  
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
450 455 460

Leu Gly Lys  
465

<210> 29  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> Послідовність амінокислот химерного ланцюга каппа людини клону 12H3

<400> 29

Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly  
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr  
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val  
35 40 45

Gly Ala Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys  
50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg  
65 70 75 80

Phe Thr Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn  
85 90 95

Val Gln Ser Glu Asp Leu Thr Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ile Asn  
100 105 110

сторінка 18

Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
115 120 125  
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
130 135 140  
Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
145 150 155 160  
Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
165 170 175  
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
180 185 190  
Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
195 200 205  
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
210 215 220  
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
225 230

<210> 30  
<211> 240  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Послідовність амінокислот CD134\_CRD2 людини (ак 1-28 >< 66-277)

<220>  
<221> СИГНАЛ  
<222> (1)...(28)

<220>  
<221> трансмембранний домен  
<222> (178)...(198)

<400> 30

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu  
1 5 10 15  
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Pro Cys Gly Pro  
20 25 30  
Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro Cys Lys Pro Cys Thr  
35 40 45  
Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys Gln Leu Cys Thr Ala  
50 55 60  
Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp  
65 70 75 80

Сторінка 19

Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe  
85 90 95

Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu  
100 105 110

Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile  
115 120 125

Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly  
130 135 140

Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg  
145 150 155 160

Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg  
165 170 175

Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly  
180 185 190

Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg  
195 200 205

Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr  
210 215 220

Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile  
225 230 235 240

<210> 31  
<211> 198  
<212> PRT  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> Послідовність амінокислот CD134\_CRD3 людини (ак 1-28 >< 108-277)

<220>  
<221> СИГНАЛ  
<222> (1)...(28)

<220>  
<221> трансмембранний домен  
<222> (136)...(156)

<400> 31

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Arg Cys Arg Ala  
20 25 30

Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro  
сторінка 20

35 40 45

Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro  
50 55 60

Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser  
65 70 75 80

Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln  
85 90 95

Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro  
100 105 110

Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val  
115 120 125

Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu  
130 135 140

Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu  
145 150 155 160

Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly  
165 170 175

Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His  
180 185 190

Ser Thr Leu Ala Lys Ile  
195

<210> 32  
<211> 179  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Послідовність амінокислот CD134\_CRD4 людини (ак 1-28 >< 127-277)

<220>  
<221> СИГНАЛ  
<222> (1)...(28)

<220>  
<221> трансмембранний домен  
<222> (117)...(137)

<400> 32

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Pro Cys Pro Pro  
20 25 30

Сторінка 21

Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn  
35 40 45  
Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser  
50 55 60  
Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu  
65 70 75 80  
Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala  
85 90 95  
Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro  
100 105 110  
Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly  
115 120 125  
Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Arg  
130 135 140  
Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser  
145 150 155 160  
Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu  
165 170 175

Ala Lys Ile

<210> 33  
<211> 159  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність  
<220>  
<223> Послідовність амінокислот процесованого CD134\_CRD4 людини (ак 1-28 ><  
147-277)  
<220>  
<221> СИГНАЛ  
<222> (1)...(28)  
<220>  
<221> трансмембранний домен  
<222> (97)...(117)  
<400> 33

Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu  
1 5 10 15  
Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Cys Thr Leu Ala  
20 25 30  
Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys  
35 40 45

Сторінка 22

Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro  
50 55 60  
Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr  
65 70 75 80  
Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala  
85 90 95  
Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu Gly Pro  
100 105 110  
Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu  
115 120 125  
Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro  
130 135 140  
Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile  
145 150 155

<210> 34  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 34

Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val  
1 5 10 15

Asp Cys Ala

<210> 35  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 35

Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val  
1 5 10 15

Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln  
20 25 30

Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu  
35 40 45

Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro  
50 55 60

Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile  
Стопінка 23

65                      70                      75                      80

Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser

85                      90                      95

Thr Arg Pro Val Glu Val Pro Gly Gly Arg Ala  
100 105

<210>	36
<211>	68
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 36

Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn Ser Ser  
1 5 10 15

Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu  
20 25 30

Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala  
35 40 45

Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu Val Pro  
50 55 60

Gly Gly Arg Ala  
65

```
<210> 37
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 37

Thr Tyr Ser Ser Pro Glu Asp Gly Ile His Glu Leu Phe Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Asp Gly Glu Glu Asp Thr Ala Glu Leu Gln Gly Gly Cys  
20 25

```
<210> 38
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 38

Arg Cys Arg Ala Gly Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val  
1 5 10 15

Asp Cys Ala Pro Cys Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln  
20 25 30

Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn

Сторінка 24

35

<210> 39  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> антисмисловий праймер mкаппа (№ праймеру: 201)

<400> 39  
gacagttagt gcagcatcag

20

<210> 40  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> антисмисловий праймер mкаппа (№ праймеру: 266)

<400> 40  
cactggatgg tgggaagatg

20

<210> 41  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> антисмисловий праймер mlgG1 (№ праймеру: 203)

<400> 41  
ggccagtggg tagacagatg

20

<210> 42  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> антисмисловий праймер mlgG1 (№ праймеру: 204)

<400> 42  
tggacaggga tccagagttc

20

<210> 43  
<211> 25  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> смисловий праймер 20E5HC (№ праймеру: 259)

<400> 43  
gcgaagtaca aytncarcac wsngg

25

<210> 44  
<211> 25  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>

Сторінка 25

<223> смисловий праймер 20E5HC (№ праймеру: 260)

<400> 44  
gcgtacaatt acarcarwsn ggncc

25

<210> 45  
<211> 22  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> смисловий праймер 20E5LC (№ праймеру: 265)

<400> 45  
gcgatataca ratgacncar ac

22

<210> 46  
<211> 21  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> антисмисловий праймер mlgG1 (№ праймеру: 416)

<400> 46  
cagtggatag acagatgggg g

21

<210> 47  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> антисмисловий праймер mكارpa (№ праймеру: 394)

<400> 47  
actggatggt gggaagatgg

20

<210> 48  
<211> 26  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> смисловий праймер сигнального пептиду (№ праймеру: 405)

<400> 48  
atgggatgga gctratcat sytctt

26

<210> 49  
<211> 26  
<212> ДНК  
<213> штучна послідовність

<220>  
<223> смисловий праймер сигнального пептиду (№ праймеру: 410)

<400> 49  
atggratgga gckgggtctt tmtctt

26

<210> 50

Сторінка 26

<211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> смисловий праймер сигнального пептиду (№ праймера: 389)  
 <400> 50  
 atgggcwtca aagatggagt caca 24  
 <210> 51  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> смисловий праймер лідерної послідовності CD134 (№ праймера: 362)  
 <400> 51  
 ctcggatccg ccaccatgtg cgtg 24  
 <210> 52  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> смисловий праймер CRD2 (№ праймера: 364)  
 <400> 52  
 actgtcactg gaccctgcgg tccc 24  
 <210> 53  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> антисмисловий праймер CRD2 (№ праймера: 365)  
 <400> 53  
 gggaccgcag ggtccagtga cagt 24  
 <210> 54  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> смисловий праймер CRD3 (№ праймера: 366)  
 <400> 54  
 actgtcactg gaaggtgcag ggct 24  
 <210> 55  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> штучна послідовність  
 <220>  
 <223> кінцевий праймер CD134 (№ праймера: 363)  
 <400> 55  
 agaattctta ttagatcttg gcca 24

Сторінка 27

<210> 56  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> антисмисловий праймер CRD3 (№ праймеру: 367)

<400> 56  
agccctgcac cttccagtga cagt

24

<210> 57  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> смисловий праймер CRD4 (№ праймеру: 368)

<400> 57  
actgtcactg gaccctgccc ccct

24

<210> 58  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> антисмисловий праймер CRD4 (№ праймера: 369)

<400> 58  
aggggggcag ggtccagtga cagt

24

<210> 59  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> процесований смисловий праймер CRD4 (№ праймеру: 370)

<400> 59  
actgtcactg gatgcaccct ggct

24

<210> 60  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> процесований смисловий праймер CRD4 (№ праймеру: 371)

<400> 60  
agccagggtg catccagtga cagt

24

<210> 61  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Штучна послідовність

<220>  
<223> Послідовність амінокислот N-кінця легкого ланцюга клону 20E5  
Сторінка 28

<400> 61

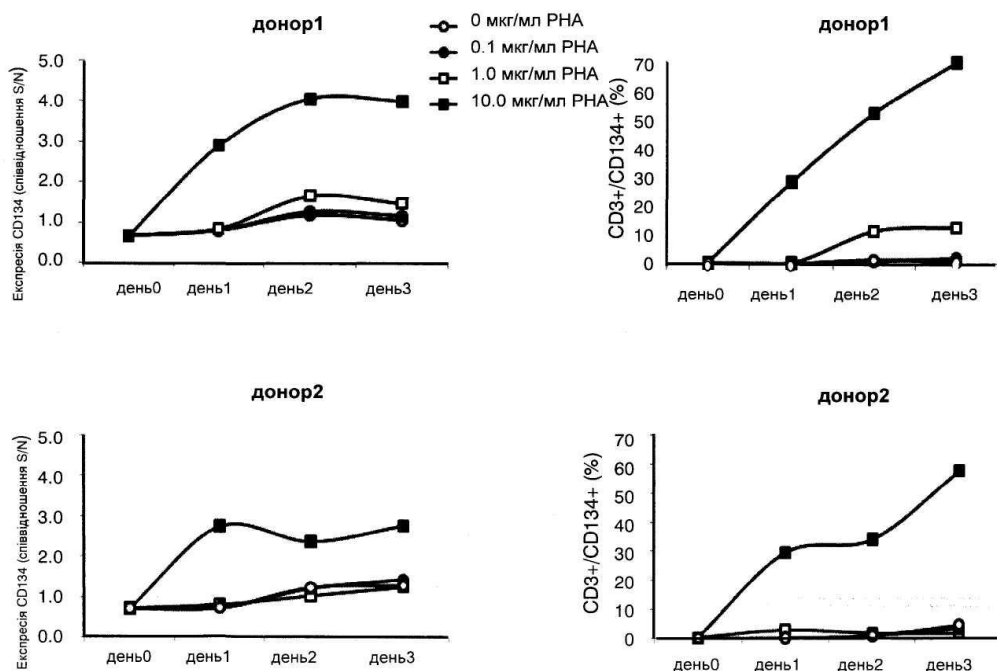
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu  
1 5 10

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Зв'язувальна молекула, яка зв'язується з CD134 людини, при цьому зазначена зв'язувальна молекула являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, що містять:
  - 5 (a) CDR1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 6;
  - (b) CDR2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 7;
  - (c) CDR3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 8;
  - (d) CDR1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 9;
  - 10 (e) CDR2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 10;
  - i (f) CDR3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 11.
2. Зв'язувальна молекула за п. 1, яка містить:
  - (a) варіабельну область важкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO: 4 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 заміни амінокислот в каркасній області; і/або
  - 15 (b) варіабельну область легкого ланцюга, що містить послідовність амінокислот SEQ ID NO: 5 або варіант зазначеної послідовності, що містить 1, 2 або 3 заміни амінокислот в каркасній області.
3. Зв'язувальна молекула за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що зазначена зв'язувальна молекула не перешкоджає зв'язуванню рецептора CD134 людини (OX40) з лігандом OX40 людини (OX40L).
4. Зв'язувальна молекула за п. 3, яка **відрізняється** тим, що вона не перешкоджає імуностимулюючим і/або проліферативним реакціям ефекторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.
- 25 5. Зв'язувальна молекула за п. 3, яка **відрізняється** тим, що вона підсилює імуностимулюючі та/або проліферативні реакції ефекторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.
6. Зв'язувальна молекула за п. 3, яка **відрізняється** тим, що вона не перешкоджає реакціям, пов'язаним із супресорною функцією, регуляторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.
- 30 7. Зв'язувальна молекула за п. 3, яка **відрізняється** тим, що вона підсилює реакції, пов'язані з супресорною функцією, регуляторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.
8. Зв'язувальна молекула за п. 3, яка **відрізняється** тим, що вона не перешкоджає проліферативним реакціям регуляторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.
- 35 9. Зв'язувальна молекула за п. 3, яка **відрізняється** тим, що вона пригнічує проліферативні реакції регуляторних Т-клітин, що експресують CD134 людини, на OX40L людини.
10. Зв'язувальна молекула за будь-яким із попередніх пунктів, яка являє собою антитіло людини або його антигензв'язуючий фрагмент.
- 40 11. Зв'язувальна молекула за будь-яким із попередніх пунктів, яка являє собою химерне, гуманізоване антитіло або антитіло DelImmune™, або їх антигензв'язуючий фрагмент.
12. Зв'язувальна молекула за будь-яким із попередніх пунктів, яка являє собою антитіло IgA, IgD, IgE, IgG або IgM, таке як IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4.
- 45 13. Зв'язувальна молекула за будь-яким із пп. 1-11, яка являє собою антигензв'язуючий фрагмент антитіла.
14. Зв'язувальна молекула за п. 13, яка **відрізняється** тим, що зазначений антигензв'язуючий фрагмент антитіла вибраний з групи, яка складається з: фрагментів Fv і Fab-подібних фрагментів.
- 50 15. Зв'язувальна молекула за п. 14, яка **відрізняється** тим, що зазначений Fv фрагмент являє собою одноклановий Fv або Fv, що зв'язаний дисульфідними зв'язками.
16. Зв'язувальна молекула за п. 14, яка **відрізняється** тим, що зазначений Fab-подібний фрагмент являє собою фрагмент Fab, фрагмент Fab' або фрагмент F(ab')<sub>2</sub>.
17. Зв'язувальна молекула за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що зазначена зв'язувальна молекула являє собою рекомбінантне антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.
- 55 18. Зв'язувальна молекула за будь-яким із попередніх пунктів, яка **відрізняється** тим, що зазначена зв'язувальна молекула являє собою моноклональне антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент.

19. Молекула нуклеїнової кислоти, що кодує зв'язувальну молекулу за будь-яким із попередніх пунктів.
20. Вектор, що містить щонайменше одну молекулу нуклеїнової кислоти за п. 19.
21. Клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 20.
- 5 22. Клітина-хазяїн за п. 21, яка **відрізняється** тим, що зазначена клітина-хазяїн отримана з ссавця або комахи.
23. Спосіб отримання зв'язувальної молекули за будь-яким із пп. 1-18, який включає етапи (i) одержання молекул, що зв'язують CD134, і (ii) проведення скринінгу зазначених молекул з метою виявлення й отримання зв'язувальних молекул, які не перешкоджають зв'язуванню
- 10 OX40L з CD134.
24. Спосіб за п. 23, який **відрізняється** тим, що етап (ii) включає виявлення зв'язувальних молекул, які зв'язуються з CD134 після впливу на CD134 насичуючої концентрації OX40L.
25. Спосіб за п. 23 або п. 24, який **відрізняється** тим, що зазначена зв'язувальна молекула являє собою моноклональне антитіло, і зазначений спосіб включає імунізацію тварини із
- 15 застосуванням CD134 людини, отримання гібридом, що секретують антитіла до CD134, і скринінг гібридом, що виробляють антитіла до CD134.
26. Зв'язувальна молекула за будь-яким із пп. 1-18 для застосування при профілактиці або при лікуванні раку у суб'єкта, що потребує цього, або для зниження розміру пухлини або пригнічення
- 20 росту ракових клітин у суб'єкта, або зниження або пригнічення розвитку метастатичного раку у суб'єкта, що страждає на рак.
27. Зв'язувальна молекула для застосування за п. 26, яка **відрізняється** тим, що зазначений рак вибраний з групи, яка складається з раку легенів, раку передміхурової залози, раку
- молочної залози, раку голови і шиї, раку стравоходу, раку шлунка, раку товстої кишки, раку
- 25 ободової і товстої кишки, раку сечового міхура, раку шийки матки, раку матки, раку яєчників, раку печінки, раку крові та будь-якого іншого захворювання або розладу, що характеризується неконтрольованим ростом клітин.
28. Спосіб посилення імунної відповіді у суб'єкта-людини, який включає введення зазначеному суб'єкту-людині терапевтично ефективної кількості зв'язувальної молекули за будь-яким із пп. 1-
- 18.
29. Спосіб за п. 28, який **відрізняється** тим, що зазначена посилена імунна відповідь включає збільшення імуностимулюючої/ефекторної функції ефекторних Т-лімфоцитів і/або придушення
- 30 імуносупресорної функції регуляторних Т-лімфоцитів.
30. Фармацевтична композиція, яка містить зв'язувальну молекулу за будь-яким із пп. 1-18 у
- сполученні з одним або більше фармацевтично прийнятними розріджувачами або допоміжними
- 35 речовинами.
31. Композиція за п. 30, яка **відрізняється** тим, що зазначена композиція підходить для парентерального введення в організм людини, наприклад внутрішньовенного,
- внутрішньом'язового, внутрішньошкірного, внутрішньочеревинного, внутрішньопухлинного,
- 40 внутрішньоміхурового, внутрішньоартеріального, інтратекального, внутрішньокапсульного, внутрішньоочного, внутрішньосерцевого, транстрахеального, внутрішньосуглобового,
- підкапсульного, субарахноїдального, внутрішньоспінального, епідурального,
- внутрішньогрудинного або підшкірного введення.

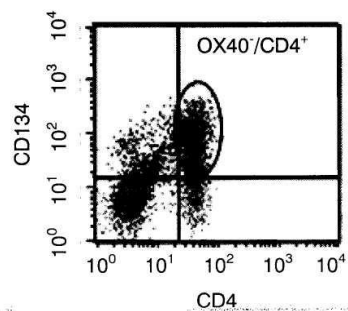
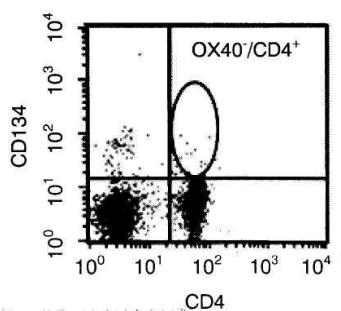
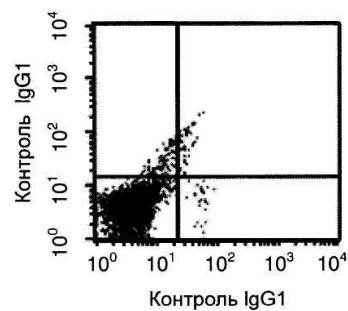
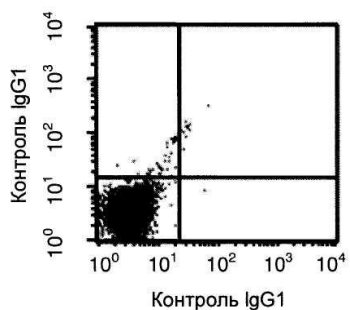
Фігура 1



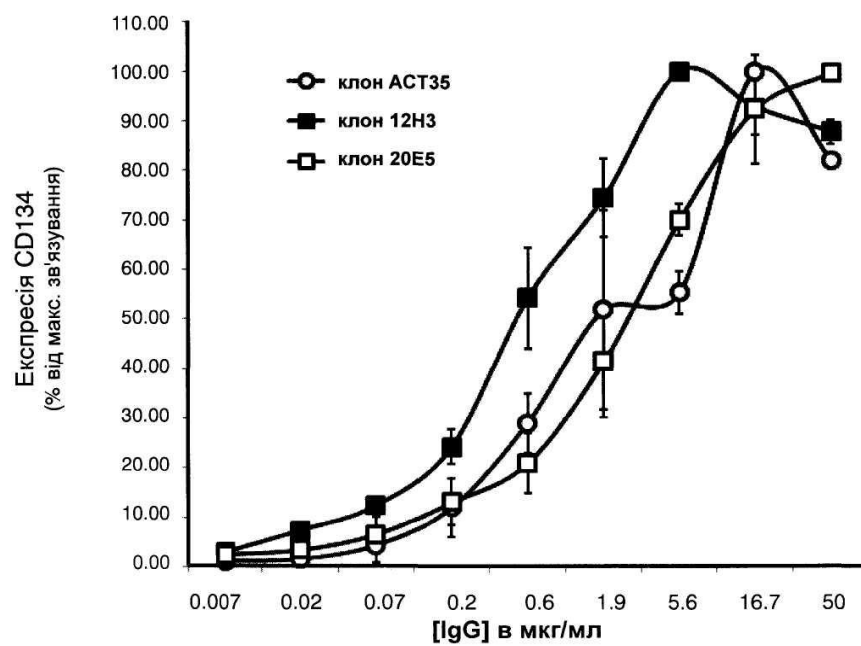
Фігура 2

Споживаючі CD4 T-лімфоцити

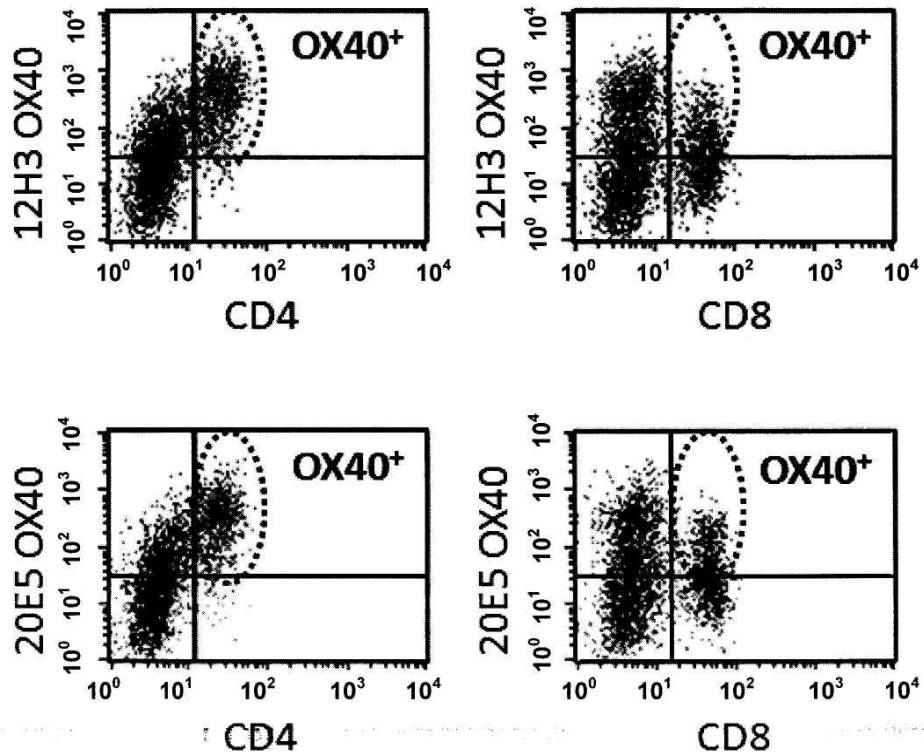
PHA-стимульовані/активовані CD4 T-лімфоцити



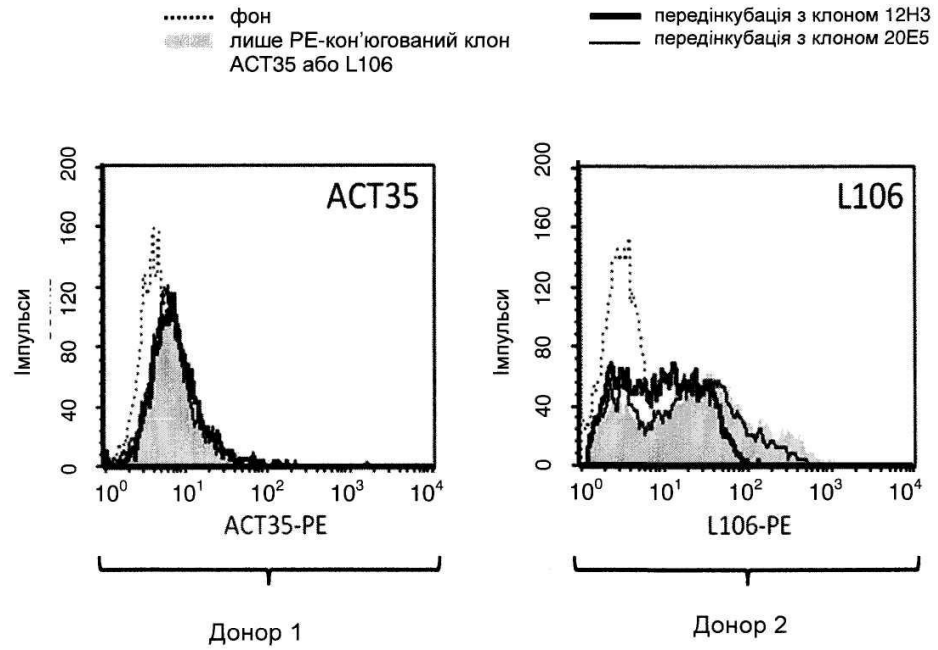
Фігура 3



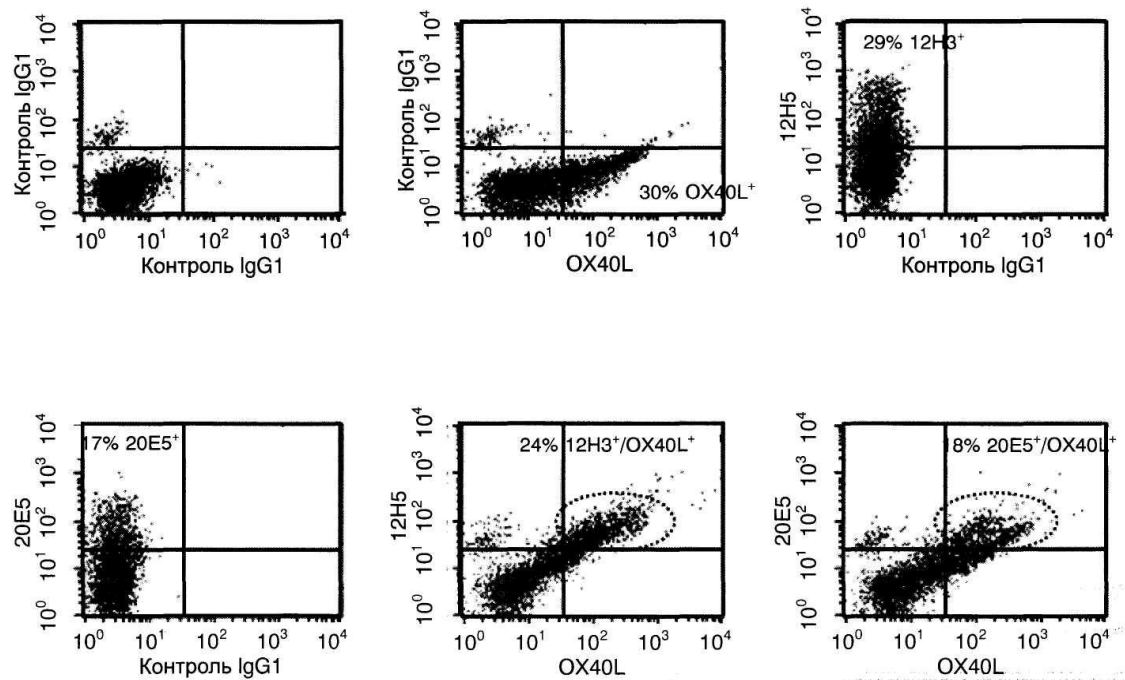
Фігура 4



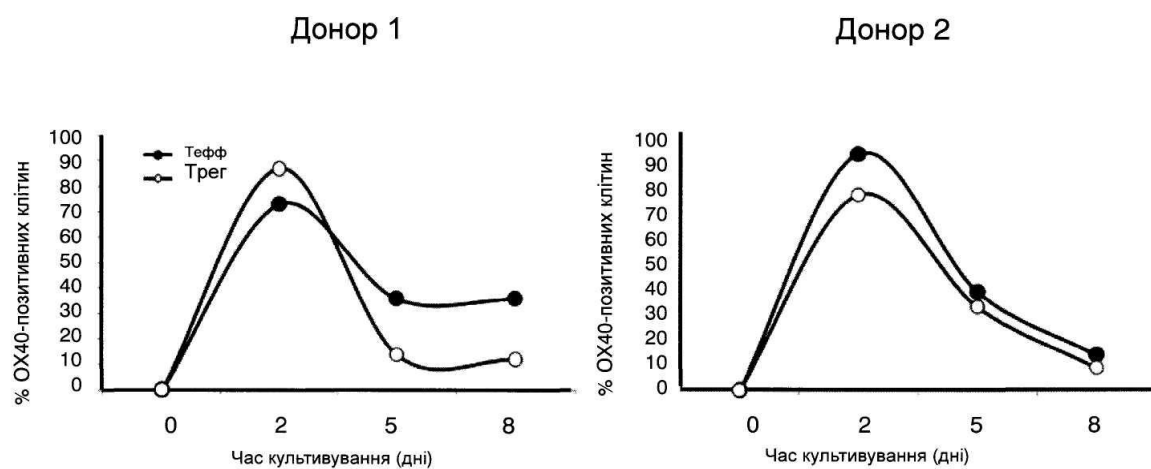
Фігура 5



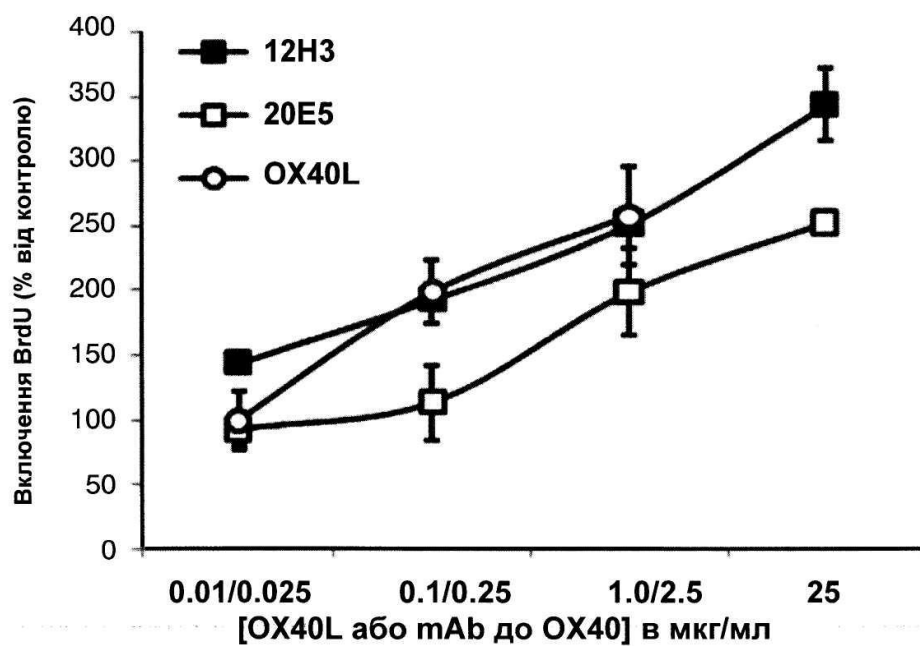
Фігура 6



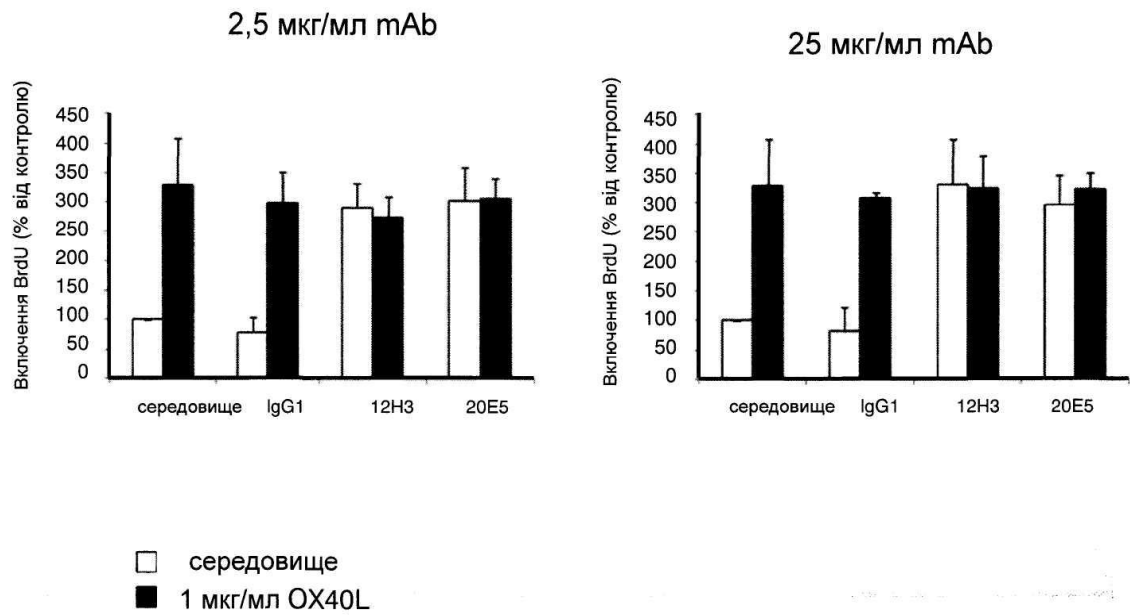
Фігура 7



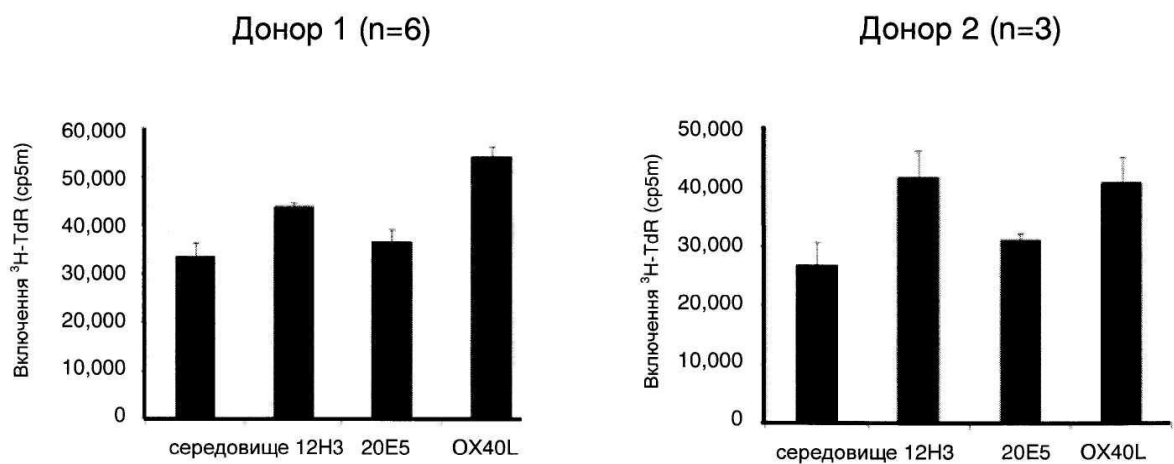
Фігура 8



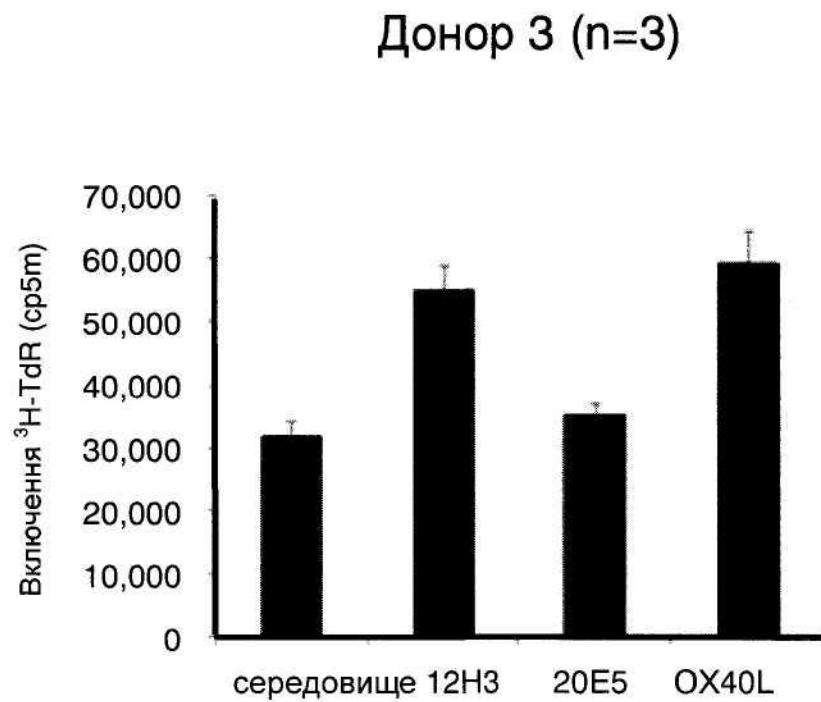
Фігура 9



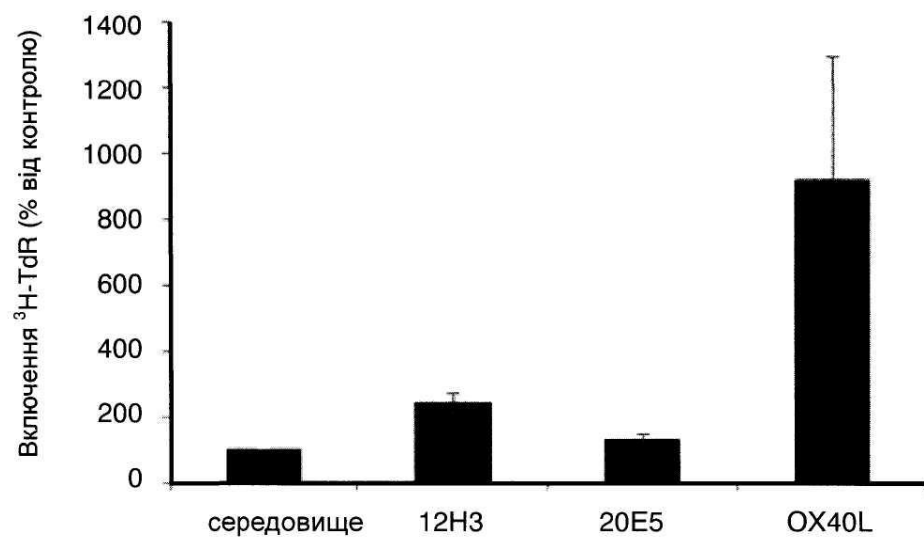
Фігура 10



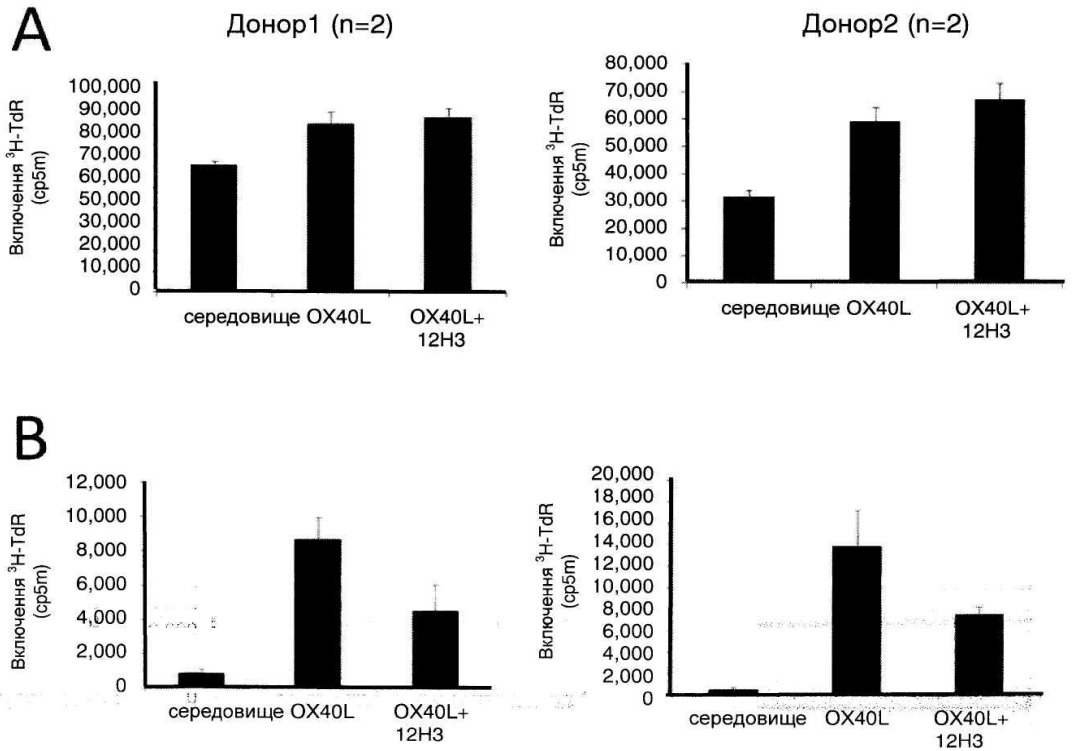
Фігура 10 (продовження)



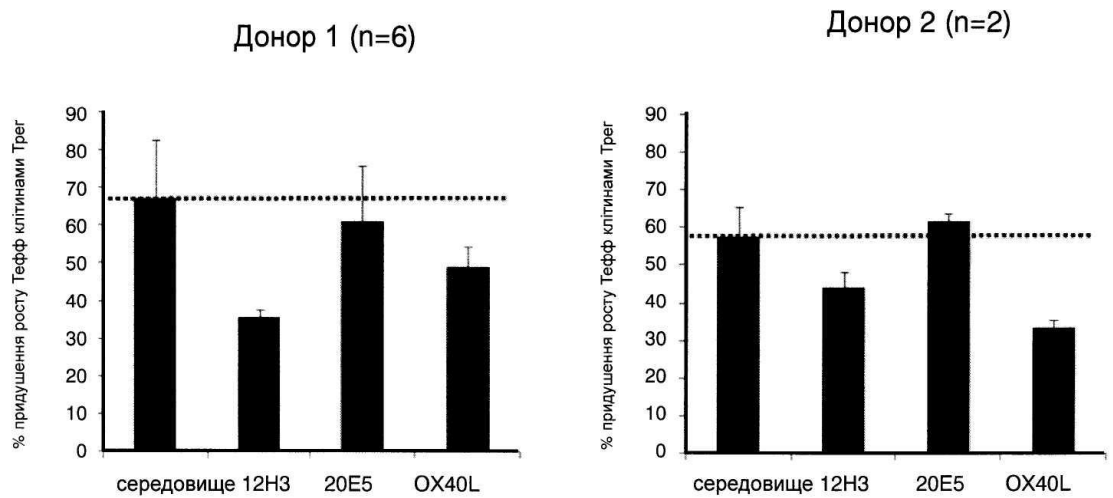
Фігура 11



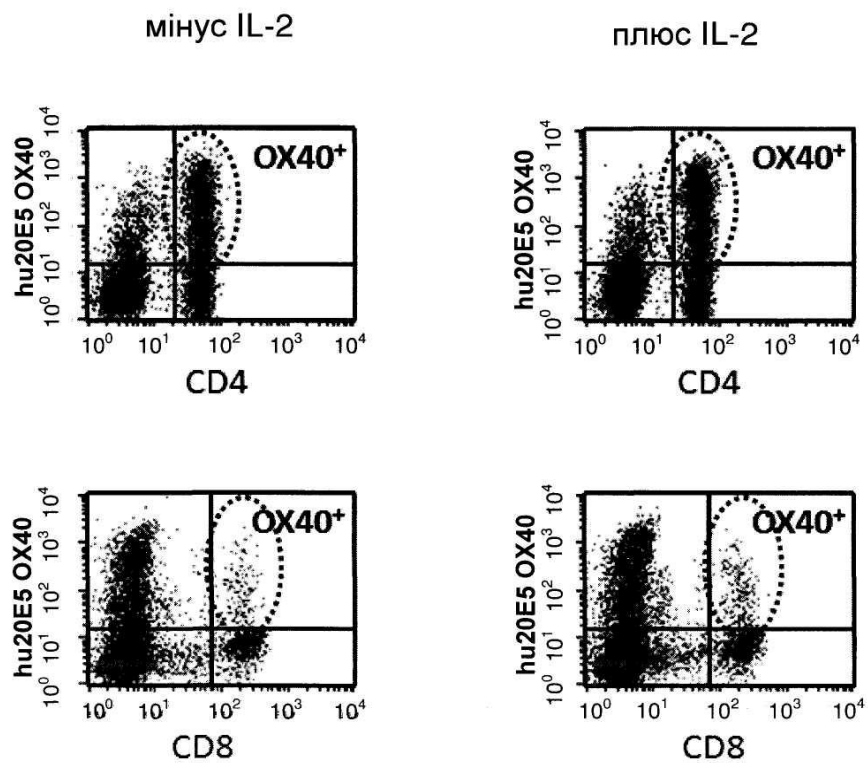
Фігура 12



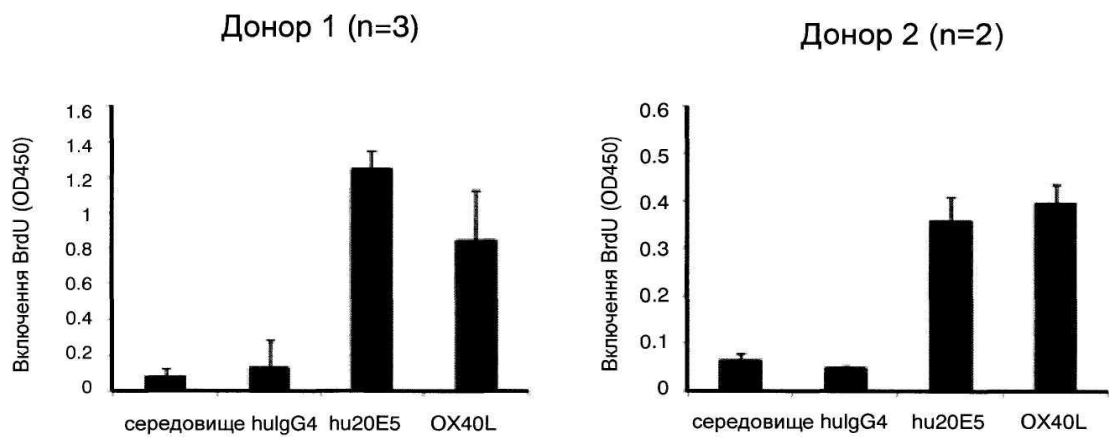
Фігура 13



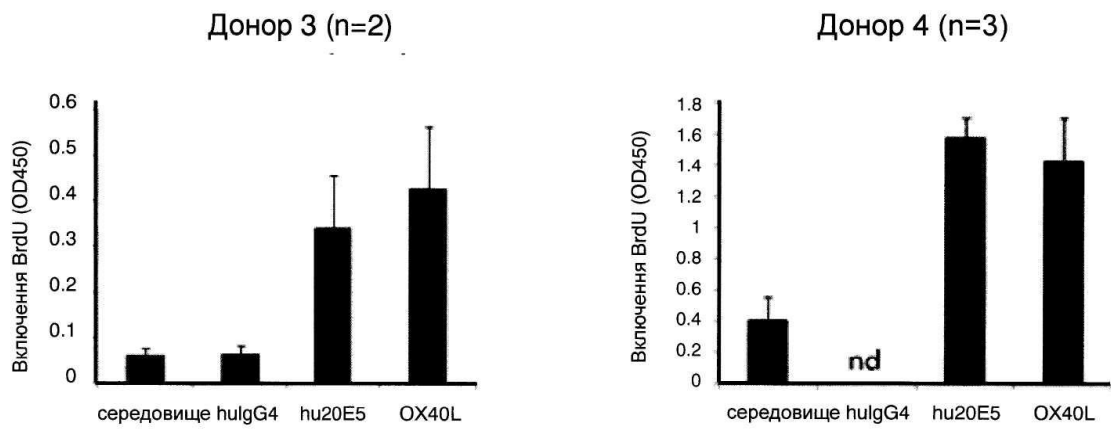
Фігура 14



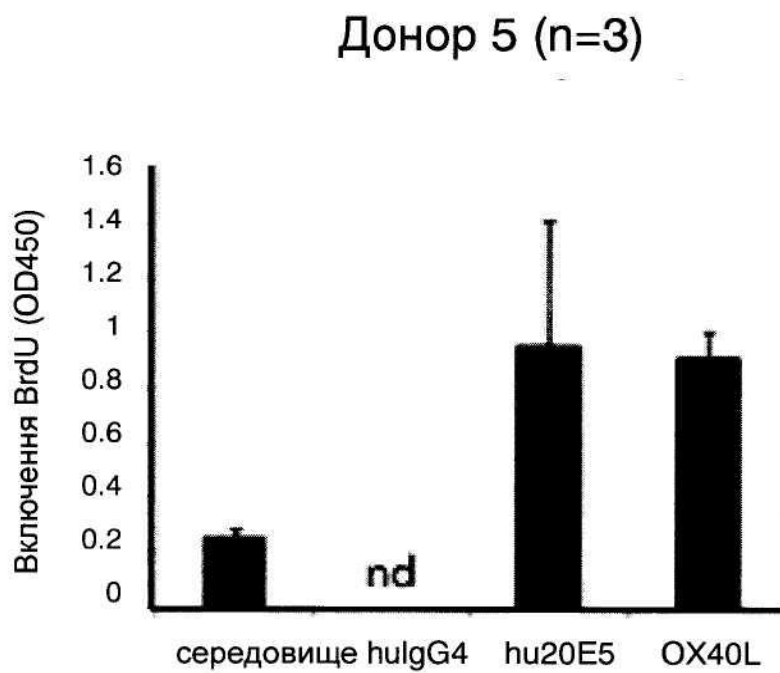
Фігура 15



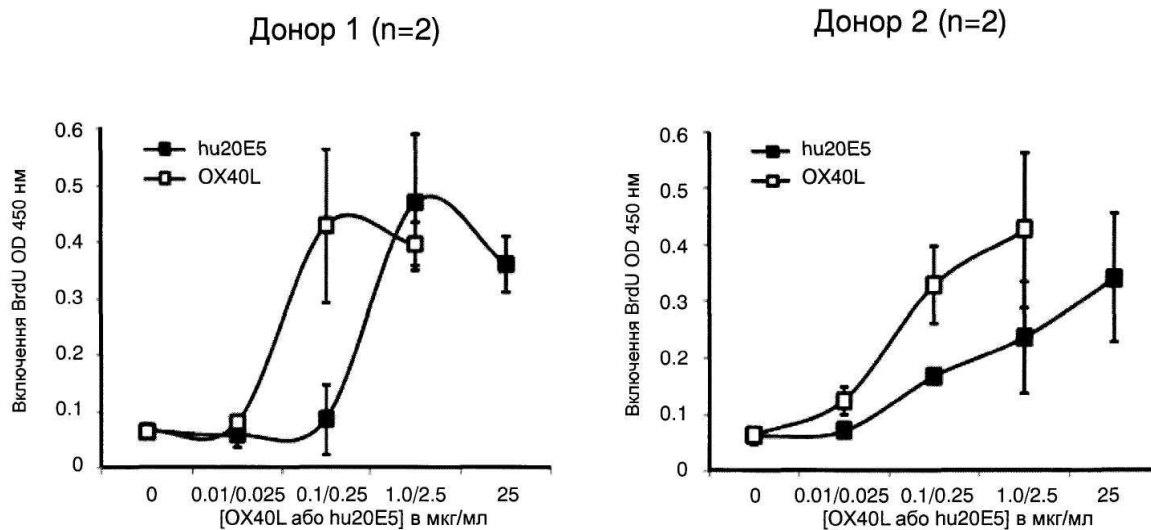
Фігура 15 (продовження)



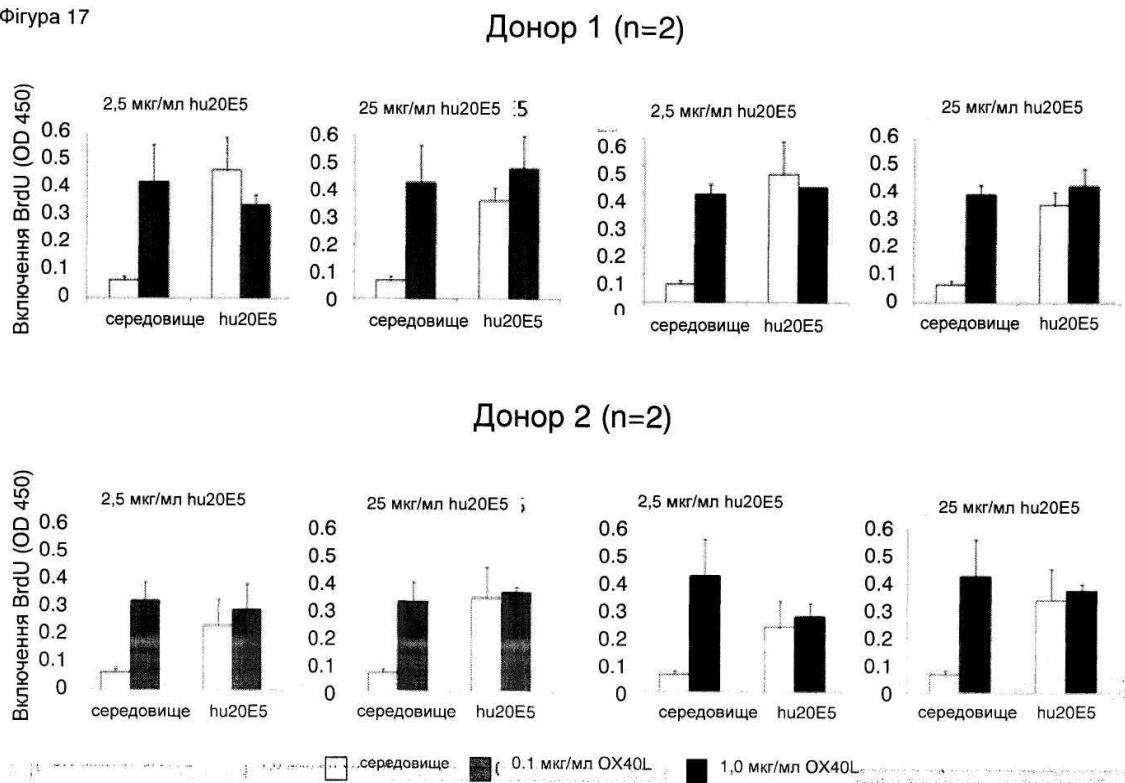
Фігура 15 (продовження)



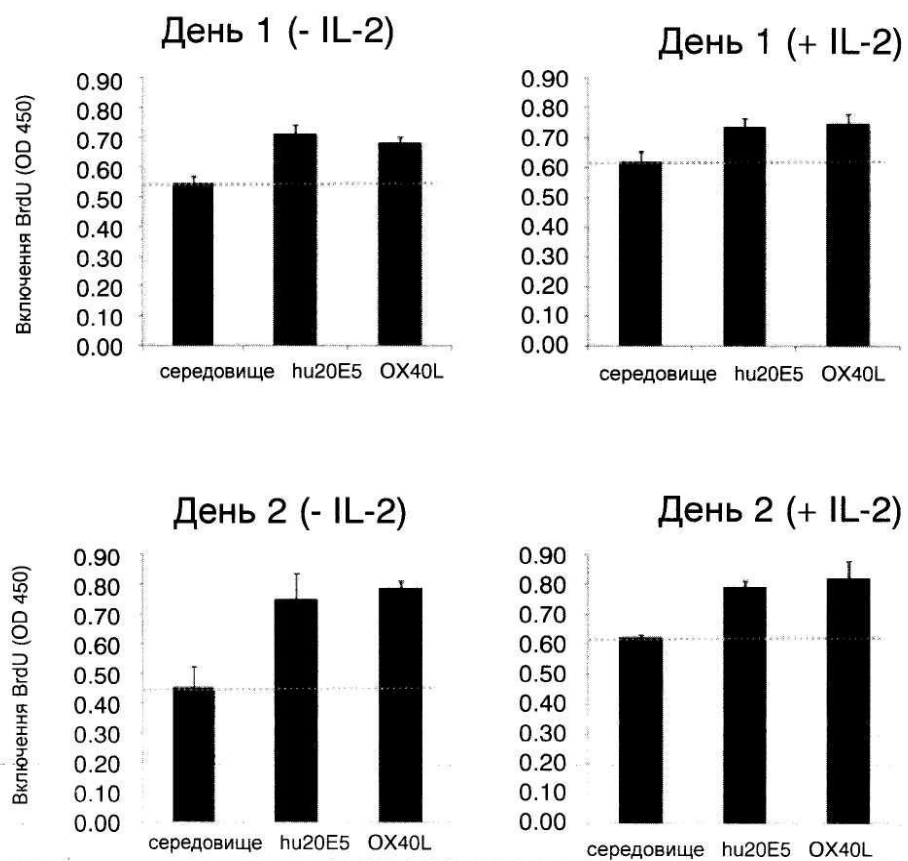
Фігура 16



Фігура 17



Фігура 18



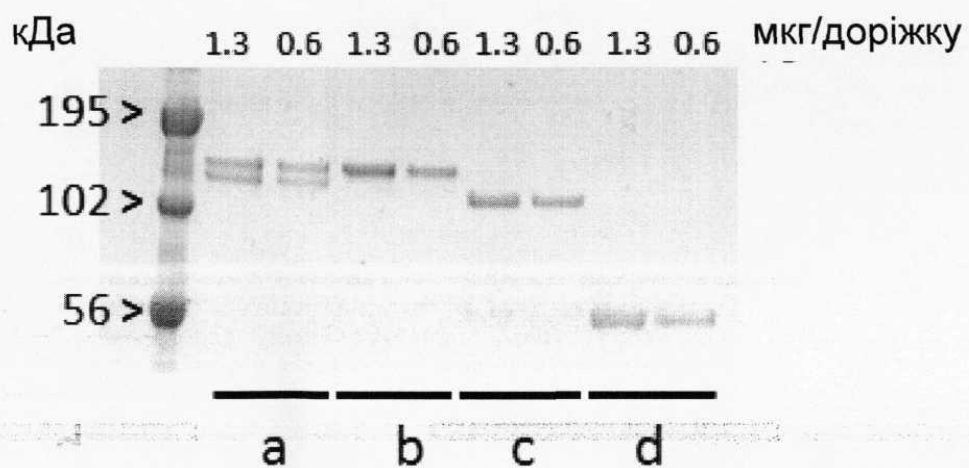
Фігура 19

**A**

	відновлення	нагрівання 70 °C
a	-	-
b	-	+
c	+	-
d	+	+

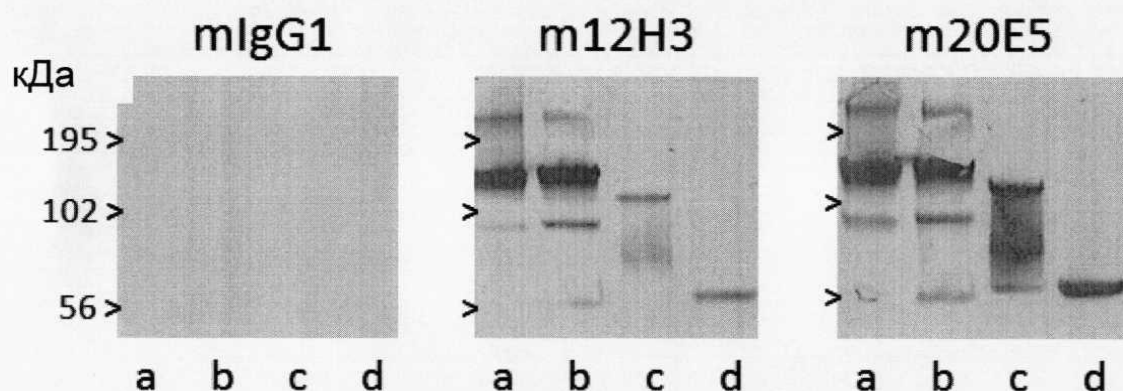
**B**

**rhuCD134**

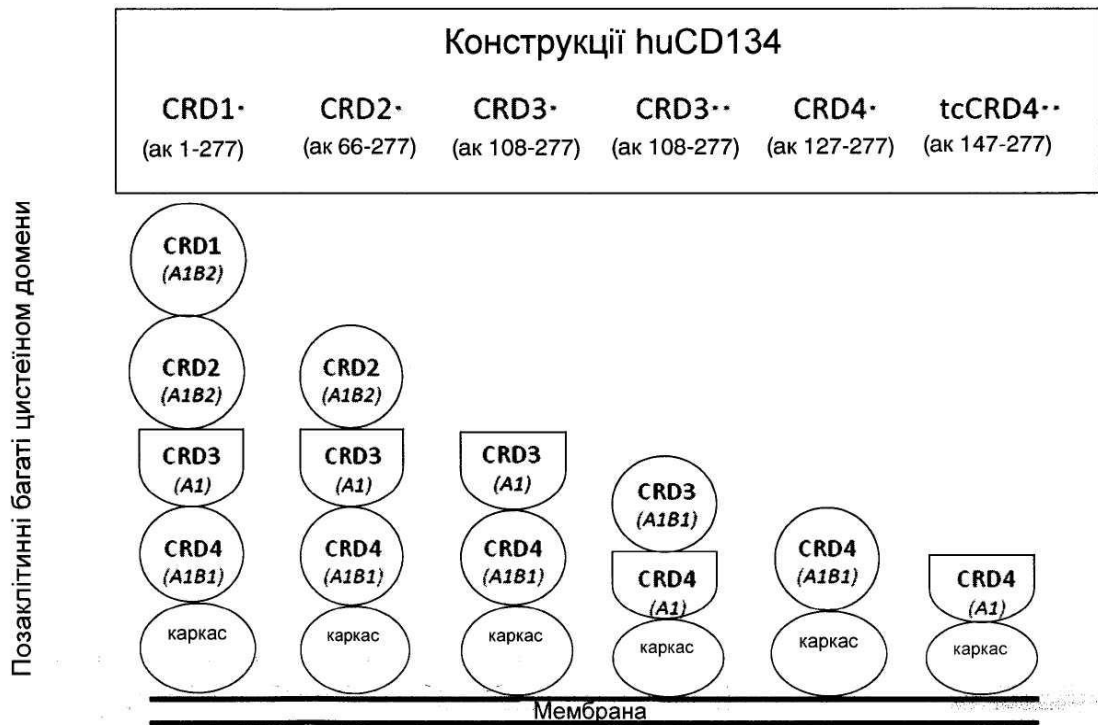


Фігура 19 (продовження)

**C**



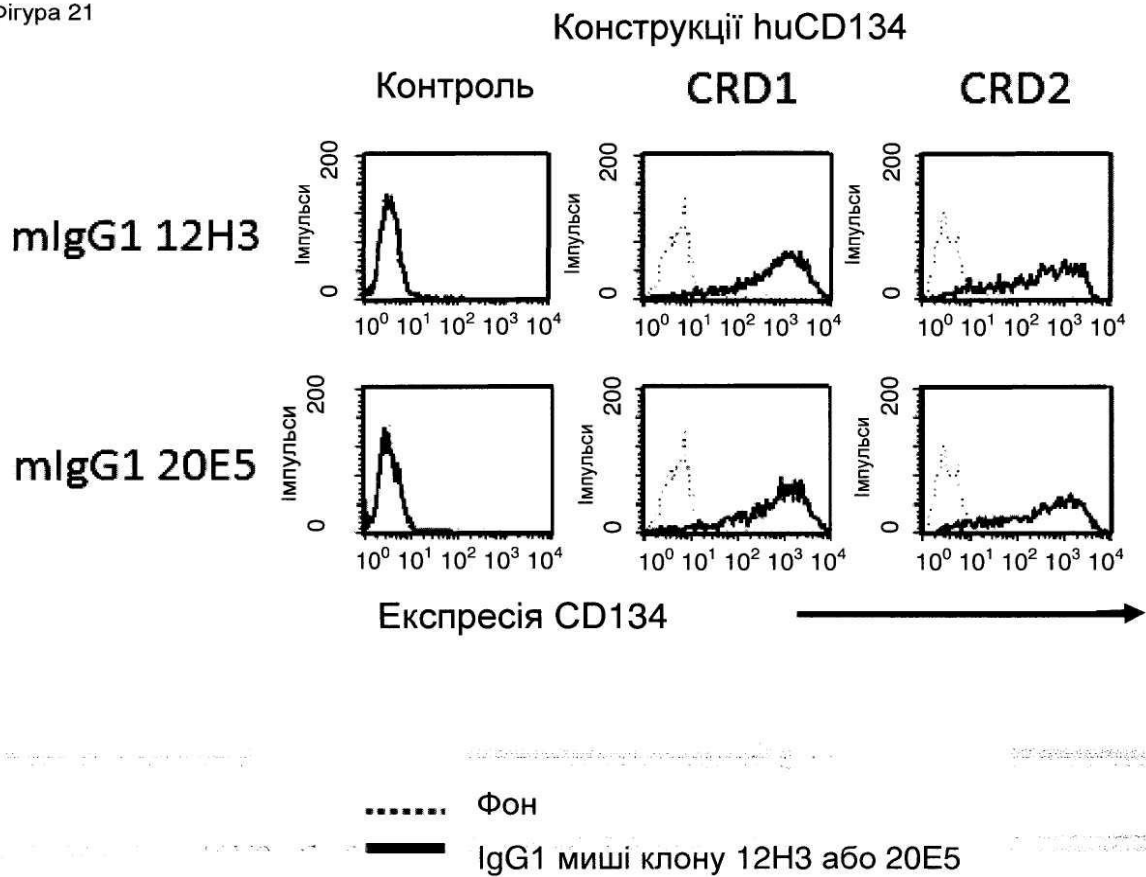
Фігура 20



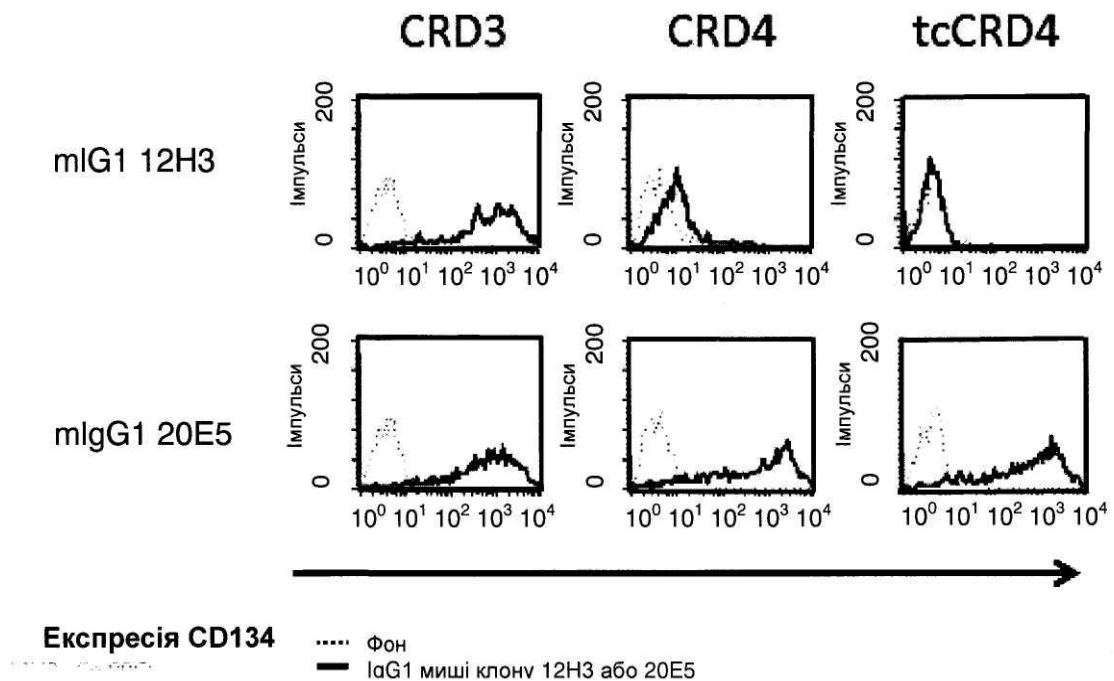
\*Відповідно до Latza *et al.* Eur J. Immunol. 1994

\*\*Відповідно до Compaan *et al.* Structure 2006

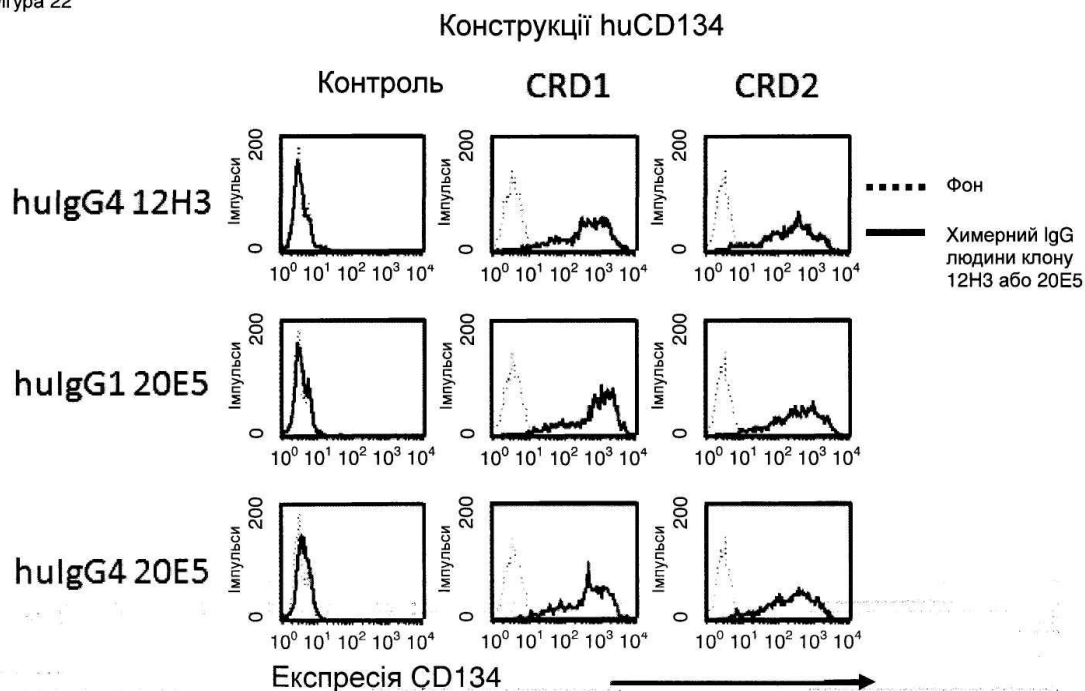
Фігура 21



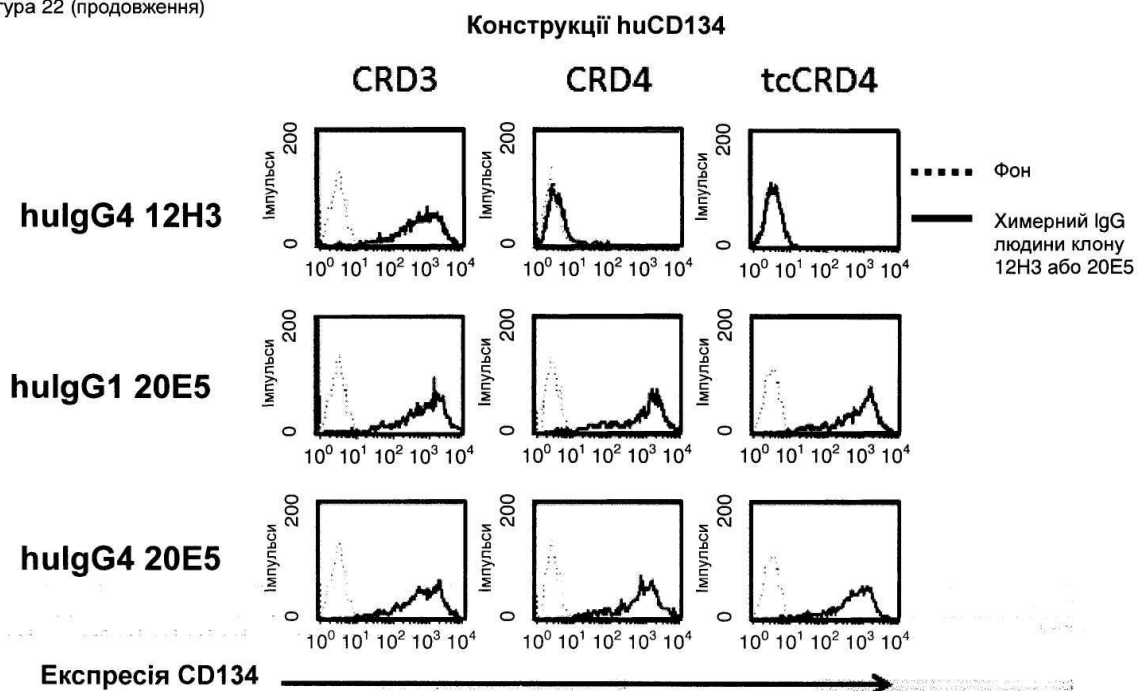
Фігура 21 (продовження)



Фігура 22

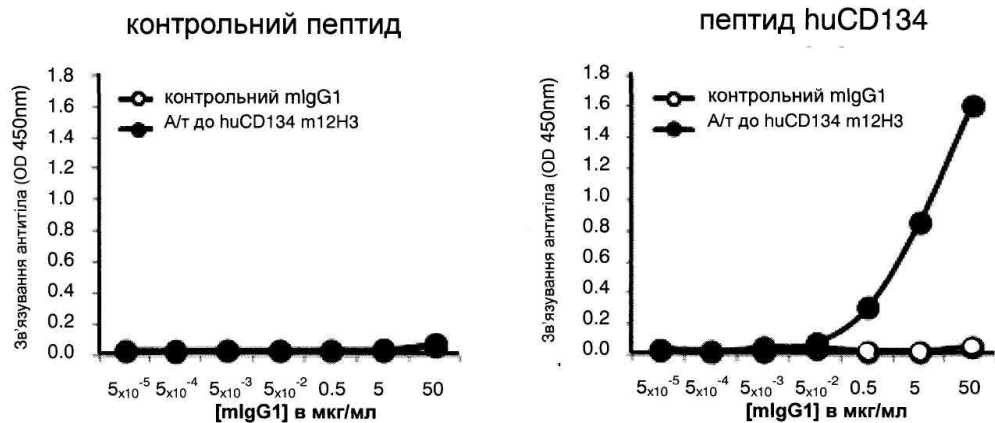


Фігура 22 (продовження)



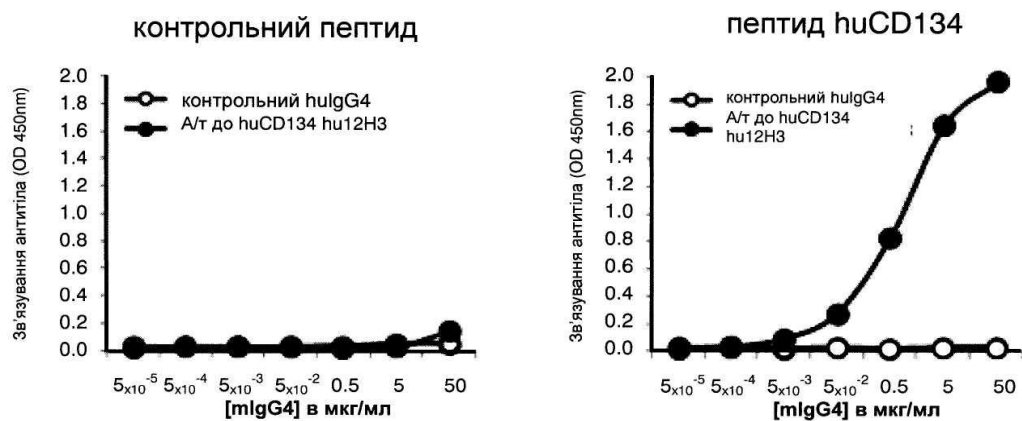
Фігура 23

**A**



Фігура 23 (продовження)

**B**



Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601